

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DE LA CURCUMINE COMME AGENT ANTI-CANCÉREUX
DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS CÉRÉBRALES.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MARIE-CLAUDE PERRY

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À LA MÉMOIRE DE MON PÈRE,
QUI FIT FACE À CETTE MALADIE
COURAGEUSEMENT.
POUR MA MÈRE,
QUI FUT TELLEMENT FORTE
TOUT AU LONG DE CETTE ÉPREUVE.

Marie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau, pour la confiance qu'il m'a accordée et l'accueil chaleureux au sein de son équipe. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux et pour m'avoir donnée le goût de la recherche. Je remercie également le Dr Michel Demeule et le Dr Anthony Régina de m'avoir guidée et épaulée tout au long de ma maîtrise. Je leur adresse toute ma reconnaissance pour leur disponibilité et je les remercie de m'avoir laissée libre d'apprendre de mes erreurs. Mes vifs remerciements à Normand Lapierre, Constance Gagnon, Julie Poirier et Isabelle Lavallée pour leur support technique et moral. Je tiens également à témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance aux membres du laboratoire de médecine moléculaire, notamment Yannève et Jean-Christophe, pour les conseils, les nombreux encouragements et les bons moments passés ensemble, ce fut très agréable de vous côtoyer. Je ne saurais manquer de remercier tout particulièrement les membres de ma famille pour leur soutien et leur amour. Fernand et Corinette, vous avez toujours été présents pour moi. C'est vous qui m'avez permis de devenir ce que je suis. Sébastien, par ton écoute et tes conseils, tu m'as donnée la force de mener à terme ce projet d'étude. Merci pour tout ce que tu m'apportes. Quant à toi Alice, tu es mon petit rayon de soleil. Enfin, je remercie le *Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada* pour son soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
PARTIE A	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
CHAPITRE I	4
LES TUMEURS CÉRÉBRALES.....	4
1.1 Épidémiologie des tumeurs intracrâniennes.....	4
1.2 Classification des tumeurs cérébrales	4
1.3 Les glioblastomes.....	7
CHAPITRE II	9
L'ANGIOGENÈSE	9
2.1 Définition	9
2.2 Angiogenèse physiologique et pathologique.....	9
2.3 L'Angiogenèse tumorale	10
2.4 Mécanismes de l'angiogenèse tumorale.....	11
2.5 Les métalloprotéases de la matrice.....	13
2.6 L'invasion et la formation des métastases.....	16
2.7 Thérapie anti-angiogénique.....	17
CHAPITRE III.....	19
LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE	19

3.1	La barrière hémato-encéphalique.....	19
3.2	Historique.....	19
3.3	Propriétés physiques et biochimiques de la barrière hémato-encéphalique	20
3.4	Les systèmes de transport de la barrière hémato-encéphalique.....	21
3.5	La P-glycoprotéine.....	21
CHAPITRE IV		24
LA NUTRATHÉRAPIE ET LA CURCUMINE.....		24
4.1	Nutrathérapie.....	24
4.2	Les composés phytochimiques.....	25
4.3	Le curcuma et la curcumine	25
4.4	Vertus médicinales de la curcumine.....	27
CHAPITRE V.....		29
PROJET DE RECHERCHE.....		29
5.1	Présentation du projet de recherche	29
PARTIE B.....		30
CONTRIBUTIONS PERSONNELLES.....		30
CHAPITRE VI		31
<i>CURCUMIN INHIBITS TUMOR GROWTH AND ANGIOGENESIS IN GLIOBLASTOMA XENOGRAFTS.</i>		31
CHAPITRE VII		68
DISCUSSION		68
7.1	Effets de la curcumine sur la croissance des cellules tumorales	69
7.2	Effets de la curcumine sur l'angiogenèse in vitro	69
7.3	Passage élevé de la curcumine au niveau de la barrière hémato-encéphalique.....	72
7.4	Effets de la curcumine sur le développement des glioblastomes in vivo	73
7.5	Effets de la curcumine sur la néovascularisation des glioblastomes in vivo.....	74
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		78
APPENDICE A.....		80

BIBLIOGRAPHIE	81
---------------------	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGE
1	PRÉSENCE D'UN GLIOBLASTOME OBSERVÉ LORS D'UNE AUTOPSIE.....8
2	LES PHASES PRÉVASCULAIRE ET VASCULAIRE CARACTÉRISANT LA PROGRESSION TUMORALE.....10
3	PRINCIPALES ÉTAPES IMPLIQUÉES DANS L'ACTIVATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES LORS DE L'ANGIOGÈNESE.....12
4	SECTION D'UN CAPILLAIRE CÉRÉBRAL.....20
5	ILLUSTRATIONS DE <i>CURCUMA LONGA</i> , LA PLANTE D'OÙ EST EXTRAIT LE CURCUMA, DE SA RACINE ET DE L'ÉPICE.....26
6	STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES CURCUMINOÏDES28

FIGURE PRÉSENTÉE DANS L'ARTICLE :

1	CHEMOPREVENTIVE AND THERAPEUTIC EFFECTS OF CURCUMIN ON U-87 HUMAN MALIGNANT GLIOMA TUMOR XENOGRAFTS GROWN SUBCUTANEOUSLY IN ATHYMIC NUDE MICE.....62
2	<i>IN VITRO</i> ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITIES OF CURCUMIN.....63
3	<i>IN VIVO</i> ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITIES OF CURCUMIN, ZYMOGRAPHY ASSAY.....64
4	<i>IN VIVO</i> ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITIES OF CURCUMIN, ANGIOGENESIS ASSAY.....65
5	HIGH TRANSCYTOSIS OF CURCUMIN ACROSS BBCEC..... 66
6	EFFECT OF CURCUMIN ON U-87 HUMAN MALIGNANT GLIOMA TUMOR XENOGRAFTS GROWN INTRACEREBRALLY IN ATHYMIC NUDE MICE.....67

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	PAGE
1 CLASSIFICATION DES TUMEURS CÉRÉBRALES HUMAINES SELON L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ.....	6
2 LES DIFFÉRENTES CLASSES DE MÉTALLOPROTÉASES DE LA MATRICE AINSI QUE LA LISTE NON EXHAUSTIVE DE LEURS SUBSTRATS	15

TABLEAU PRÉSENTÉ DANS L'ARTICLE :

I	<i>IN VIVO</i> ANTI-TUMOR ACTIVITY OF CURCUMIN AGAINST SUBCUTANEOUSLY IMPLANTED HUMAN MALIGNANT GLIOMA (DOSE DETERMINATION).....	60
II	<i>IN VIVO</i> ANTI-TUMOR ACTIVITY OF CURCUMIN AGAINST SUBCUTANEOUSLY IMPLANTED HUMAN MALIGNANT GLIOMA (CHEMOPREVENTIVE AND THERAPEUTIC EFFECTS).....	61

TABLEAU PRÉSENTÉ DANS L'APPENDICE:

3	EFFET DE LA CURCUMINE SUR L'ACTIVITÉ DE TRANSPORT DE LA P-GP DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES DE CAPILLAIRES CÉRÉBRAUX BOVIN.....	80
---	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BBCEC	<i>Bovine brain capillary endothelial cells</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAM	<i>Chorioallantoic membrane</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GBM	Glioblastome multiforme
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IC50	Concentration inhibant 50% de la prolifération cellulaire
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
P-gp	P-glycoprotéine
RBE4	<i>Rat brain capillary endothelial cells</i>
SNC	Système nerveux central
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

RÉSUMÉ

Parmi les composés pharmacologiques à moindres risques pouvant inhiber la prolifération de cellules tumorales, une faible proportion présentent un potentiel prometteur d'utilisation comme agent anti-cancéreux. Or, plusieurs études récentes réalisées majoritairement *in vitro* ont montré que la curcumine, la composante active du cari, présentait des propriétés chimiopréventives et anti-tumorales intéressantes. Nous avons donc évalué la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement de gliomes *in vitro* et *in vivo*. Le potentiel d'utilisation de la curcumine a d'abord été estimé sur une lignée de glioblastome en culture (U87) par des essais de prolifération. Ces essais ont permis de déterminer la concentration qui inhibait 50% de la prolifération cellulaire (IC50), soit 11,6 μ M pour ce composé. L'efficacité anti-cancéreuse de la curcumine a ensuite été démontrée *in vivo* en traitant des souris athymiques ayant subi des implantations sous-cutanées et intracrâniennes de U87. L'impact du traitement (60 mg/kg/jour et 120 mg/kg/jour respectivement) sur la croissance tumorale (taille des tumeurs) et la survie des animaux a été estimé. Les résultats ont montré que la curcumine exerce un effet anti-cancéreux sur les tumeurs sous-cutanées, provoquant un ralentissement significatif de la croissance tumorale. De plus, un accroissement du temps de survie moyen a été observé chez les souris traitées ayant subi une implantation intracrânienne de cellules cancéreuses. Cette action anti-tumorale de la curcumine serait potentiellement due à un effet anti-angiogénique. D'une part, une inhibition de la prolifération, de la migration et de la tubulogénèse a été observée sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales ayant été traitée avec la curcumine. D'autre part, les résultats ont montré une inhibition de l'activation de métalloprotéases de la matrice, des enzymes importantes pour la croissance tumorale, chez les souris ayant reçu de la curcumine. De plus, le dosage du contenu en hémoglobine dans les tumeurs, qui permet de quantifier le niveau de prolifération des vaisseaux sanguins, a montré que les tumeurs sous-cutanées des souris ayant reçu de la curcumine avaient une concentration d'hémoglobine moindre que les tumeurs provenant des souris non-traitées. Par ailleurs, nos études ont aussi démontré que le passage de la curcumine au travers la barrière hémato-encéphalique est très élevé. Ces résultats suggèrent que la curcumine possède des propriétés anti-cancéreuses intéressantes sur les glioblastomes et peut être considéré comme un agent dans la prévention et le traitement des tumeurs cérébrales.

Mots clés : curcumine, gliome, anti-tumorale, anti-angiogénique, barrière hémato-encéphalique

INTRODUCTION

Les cellules endothéliales, qui forment les capillaires sanguins, jouent un rôle considérable dans le développement des tumeurs cérébrales. D'une part, ces cellules permettent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui viendront alimenter la tumeur en nutriments et la débarrasser de ses déchets métaboliques (Folkman, 1990). En absence de ce processus, appelé angiogenèse, une tumeur ne peut se développer au-delà de 1 à 2 mm³ et demeure dans un état latent et bénin (Folkman, 1990). L'inhibition de l'angiogenèse tumorale semble donc une cible thérapeutique de choix dans le traitement du cancer.

D'autre part, les cellules endothéliales formant les capillaires cérébraux, permettent la création de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière, qui a pour rôle de protéger le tissu cérébral de la plupart des variations auxquelles le reste du corps est soumis, empêche le passage de nombreuses substances incluant la plupart des agents de chimiothérapie (Fromm, 2004; Lin, 2004). La BHE permet donc la création d'un sanctuaire anatomique protégé de l'action des médicaments, rendant ainsi très difficile le traitement des tumeurs cérébrales (Fromm, 2004; Lin, 2004). Le passage de la BHE est, de ce fait, crucial pour tout agent voulant être utilisé dans le traitement du cancer du cerveau (Begley, 2004).

Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire ont porté sur l'évaluation de la curcumine, un composé naturel extrait du rhizome d'une plante de la famille du gingembre, comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Chronologiquement, nous avons déterminé l'efficacité anti-cancéreuse de la curcumine sur une lignée de glioblastome en culture (U87). *In vitro*, des essais de prolifération ont été réalisés pour déterminer les concentrations qui inhibent la prolifération cellulaire. *In vivo*, l'efficacité anti-cancéreuse de la curcumine a été démontrée en traitant des souris immunosupprimées ayant subi une implantation en sous-cutané et en intracrânien de cellules cancéreuses. L'impact du traitement sur la survie des animaux (mesurée en jours), sur la croissance tumorale (taille des tumeurs) ainsi que sur l'expression de métalloprotéases de la matrice, des marqueurs moléculaires importants lors de la croissance tumorale, a été analysé lors de cette étude.

Nous avons également vérifié si la curcumine était capable de traverser la BHE afin d'atteindre le tissu cérébral. L'évaluation du passage de la curcumine a été faite à l'aide d'un modèle développé par l'équipe du Dr Cechelli, consistant en une co-culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins (*bovine brain capillary endothelial cells*, BBCEC) et d'astrocytes de rats nouveaux-nés. Ce modèle génère la formation d'une barrière présentant toutes les caractéristiques de la BHE, en termes de restriction de perméabilité et d'expression de transporteurs spécifiques, permettant l'analyse du passage de la curcumine. Le coefficient d'extinction molaire élevé de la curcumine a permis de suivre son passage en fonction du temps par des mesures d'absorbance du milieu. Finalement, afin d'élucider le mécanisme d'action par lequel la curcumine a un effet anti-cancéreux sur les tumeurs cérébrales, nous avons étudié son impact sur les principales étapes impliquées dans l'angiogenèse : l'accroissement du nombre des cellules endothéliales, leur migration et leur différenciation. Nous avons également évalué la teneur en hémoglobine des tumeurs sous-cutanées des souris traitées et non-traitées afin d'évaluer le niveau de prolifération des vaisseaux sanguins dans ces dernières.

La première partie de ce travail (chapitres I à V) fait état des connaissances sur les principaux sujets d'étude de ce mémoire : les tumeurs cérébrales, l'angiogenèse, la barrière hémato-encéphalique et la curcumine. Dans la seconde partie de cet ouvrage (chapitre VI et VII), les résultats obtenus lors de la maîtrise sont présentés sous forme d'un article scientifique qui est commenté par la suite.

PARTIE A

ÉTAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I

LES TUMEURS CÉRÉBRALES

1.1 Épidémiologie des tumeurs intracrâniennes

Au cours des dernières décennies, l'incidence des tumeurs cérébrales n'a cessé d'augmenter (Brandes, 2003). À l'heure actuelle, les tumeurs intracrâniennes constituent 2% de l'ensemble des cancers chez l'adulte (selon la Société Canadienne du Cancer)¹. Environ 8 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an sont recensés (Société Canadienne du Cancer)¹. Ces tumeurs représentent la troisième cause de mortalité chez les adultes (Chintala, Tonn, et Rao, 1999). D'autre part, ce type de cancer est la deuxième cause de mortalité chez les enfants après les leucémies (Chintala et al., 1999). Elles constituent 15% des cancers de cette tranche d'âge et ont une incidence de 3 pour 100 000 enfants par an au Canada (Société Canadienne du Cancer)¹.

Actuellement, il n'existe aucun moyen permettant d'anticiper ou d'empêcher l'apparition des tumeurs intracrâniennes. De plus, un pronostic défavorable leur est souvent associé. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux agents ayant une toxicité minimale et un effet durable afin de prévenir et traiter ce type de cancer.

1.2 Classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales résultent d'une multiplication accrue et anarchique de cellules anormales. Elles peuvent soit se développer à partir de cellules du cerveau (tumeurs intracrâniennes primaires), soit provenir d'une tumeur située ailleurs dans l'organisme (tumeurs secondaires ou métastatiques) (Demeule et al., 2004; Tysnes et Mahesparan, 2001) (Tableau 1). Chez l'homme adulte, les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes sont les gliomes. Ils représentent à eux seuls 50 % de celles-ci. (Louis, Pomeroy, et Cairncross, 2002).

¹ Informations tirées du site Internet : <http://www.cancer.ca>

Histologiquement, les gliomes sont classifiés comme étant des astrocytomes, des oligodendrogliomes ou des oligoastrocytomes en fonction des cellules qui leur ont donné naissance (astrocyte ou oligodendrocyte) (Chintala et al., 1999).

Les astrocytomes forment un ensemble complexe de tumeurs cérébrales qui peuvent survenir à tout âge. Elles peuvent être bénignes ou malignes (Fischer et al., 2005). Les astrocytomes ont été subdivisés par l'Organisation Mondiale de la Santé selon leur degré de malignité en astrocytomes pilocytiques (grade I), en astrocytomes diffus (grade II), en astrocytomes anaplasiques (grade III) et en glioblastomes (grade IV) (Fischer et al., 2005). Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs bénignes qui se caractérisent par un faible degré d'invasion tissulaire et une masse tumorale circonscrite (Chintala et al., 1999). Les astrocytomes diffus sont considérés comme des tumeurs semi-bénignes. Elles ont la propriété d'être plus invasives et de diffuser légèrement (Chintala et al., 1999). Les astrocytomes anaplasiques sont des cancers semi-malins présentant un caractère assez invasif et un degré de diffusion modéré (Chintala et al., 1999). Les glioblastomes multiformes (GBM) sont, quant à eux, des cancers malins se caractérisant par un niveau de diffusion et d'invasion élevé (Chintala et al., 1999).

Tableau 1 : Classification des tumeurs cérébrales humaines selon l'Organisation Mondiale de la Santé (version simplifiée d'après Kleihues (Kleihues et Sobin, 2000)).

Tumeurs Primaires

○ Tumeurs du tissu neuroépithélial

▪ Gliomes

• Tumeurs astrocytaires

- Astrocytome pilocytique (grade I)
- Astrocytome diffus (grade II)
- Astrocytome anaplasique (grade III)
- Glioblastome multiforme (grade IV)

• Tumeurs oligodendrogiales

• Tumeurs mixtes (oligoastrocytomes)

▪ Tumeurs épendymaires

▪ Tumeurs mixtes glio-neuronales

▪ Tumeurs pinéales

▪ Tumeurs embryonnaires

○ Tumeurs des méninges

○ Lymphome primitif du système nerveux central

○ Tumeurs de la région sellaire

Tumeurs Secondaires (Tumeurs Métastatiques)

○ Cérébrales

○ Durales

○ Méningées

1.3 Les glioblastomes

De tous les types de gliomes, ce sont les GBM qui sont à la fois les plus invasifs et les plus répandus (Kargiotis, Rao, et Kyritsis, 2006). Ils représentent à eux seuls la moitié des cas de gliomes (Grossman et Batara, 2004). Ils peuvent soit apparaître en tant que tumeurs primaires, soit survenir suite à la progression d'astrocytomes de plus faible grade (Tysnes et Mahesparan, 2001). Ils se localisent dans la substance blanche de l'un des deux hémisphères et s'accompagnent généralement d'un œdème important (Preusser, Haberler, et Hainfellner, 2006). Ce type de tumeurs augmente rapidement de volume et se caractérise par un niveau de vascularisation élevé (Kesari et al., 2005; Preusser et al., 2006). Les GBM se traduisent par des signes neurologiques comme la paralysie, des troubles sensitifs ou une hypertension intracrânienne, ceux-ci causés par des lésions de cellules nerveuses (Grossman et Batara, 2004). Généralement, les GBM sont plus fréquents chez les hommes caucasiens et les sujets d'âge avancé (Grossman et Batara, 2004).

Le traitement de ces tumeurs repose sur l'ablation, lorsqu'elle est possible, la radiothérapie et la chimiothérapie (Gilbert et Loghin, 2005). Cependant, ces options thérapeutiques parviennent difficilement à éliminer les GBM. En effet, dans la plupart des cas, la chimiothérapie ou la chirurgie montrent peu d'impact à cause de la nature infiltrante et agressive de ce genre de tumeur (Desjardins et al., 2005; Fujimaki, 2005; Gilbert et Loghin, 2005). De plus, la radiothérapie traditionnelle a seulement un effet palliatif, les gliomes étant parmi les tumeurs humaines les plus réfractaires à ce type de traitement (Grossman et Batara, 2004; Walker et al., 1980). Conséquemment, les patients diagnostiqués avec un glioblastome ont un pronostic défavorable, la survie médiane étant seulement de 9 à 15 mois avec le traitement multimodal (Grossman et Batara, 2004). Peu d'entre eux survivent plus de 2 ans (Grossman et Batara, 2004). Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour ces patients.

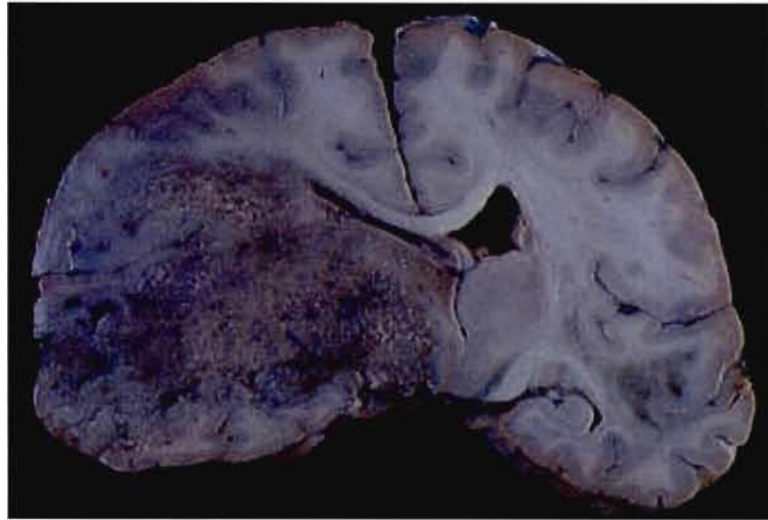


Figure 1 : Présence d'un glioblastome observé lors d'une autopsie. Énorme tumeur nécrotique et hémorragique occupant une grande partie de l'hémisphère gauche.
(Figure tirée du site Internet : <http://anocef.unice.fr/atlasneuro/fr/m/mPIV01a1.html>)

CHAPITRE II

L'ANGIOGENÈSE

2.1 Définition

Toutes les tumeurs solides, y compris les gliomes, sont dépendantes de la mise en place d'un réseau vasculaire adéquat afin de croître et se développer (Carmeliet et Jain, 2000; Folkman, 1995; Mentlein et Held-Feindt, 2003). Ce processus de néovascularisation, qui implique les cellules endothéliales, se nomme angiogenèse. Par définition, l'angiogenèse représente l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Yance et Sagar, 2006).

2.2 Angiogenèse physiologique et pathologique

L'angiogenèse se produit lors de certains processus biologiques comme la guérison des plaies, l'embryogenèse, l'inflammation, le cycle reproducteur féminin et le développement d'une circulation sanguine collatérale suivant l'occlusion de vaisseaux sanguins (Liekens, De Clercq, et Neyts, 2001). En conditions physiologiques normales, ce processus est finement contrôlé et le réseau vasculaire demeure quiescent chez les mammifères adultes.

Lorsque la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins devient incontrôlée, par une angiogenèse excessive ou insuffisante, le processus angiogénique peut contribuer au développement et à la progression de diverses pathologies. L'artériosclérose, le diabète, l'emphysème, la maladie de Crohn et l'ostéoporose sont des maladies associées à une angiogenèse insuffisante (Carmeliet, 2005). Le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, les rétinopathies, les ulcères duodénaux, l'invasion tumorale et la formation de métastases sont des exemples de pathologies impliquant une néovascularisation excessive (Liekens et al., 2001).

2.3 L'Angiogenèse tumorale

C'est Judah Folkman qui proposa en 1971 l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale dépendait de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Folkman, 1971). Depuis, plusieurs études ont montré que la croissance des tumeurs et l'expansion métastatique sont strictement contrôlées par la néovascularisation (Folkman, 2003). En effet, lors du développement tumoral, les cellules cancéreuses traversent deux phases; une phase prévasculaire et une phase vasculaire. La première phase, dite dormante, se caractérise par une masse tumorale inférieure à 1 mm^3 qui reste dans un état latent et bénin (Yance et Sagar, 2006). La seconde phase, dite angiogénique et invasive, permet à la tumeur de croître au-delà de 1 mm^3 , de se développer dans le tissu hôte et éventuellement d'envahir le tissu avoisinant (Yance et Sagar, 2006). Le passage entre ces deux phases est contrôlé par un relais moléculaire appelé «switch» angiogénique (Yance et Sagar, 2006).

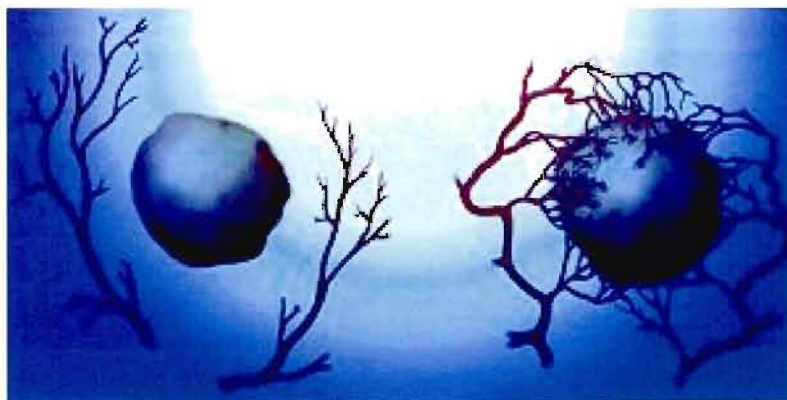


Figure 2 : Les phases prévasculaire et vasculaire caractérisant la progression tumorale. La tumorigénèse est d'abord caractérisée par une phase prévasculaire et latente (image de gauche). Par la suite, lorsque la tumeur acquiert 1 mm^3 , on observe une transition vers une phase vasculaire et invasive (image de droite).

(Figure tirée du site Internet : www.ulg.ac.be/le15jour/157/angiogenese.shtml)

En dessous de 1 mm^3 , les cellules tumorales peuvent s'approvisionner en nutriments et en oxygène par simple diffusion. En effet, la distance de diffusion de l'oxygène à partir des capillaires sanguins est de 150 à 200 μm (Yance et Sagar, 2006). Lorsque les cellules se

trouvent à une distance supérieure, elles meurent d'hypoxie. Ainsi, l'expansion de la tumeur au-delà de 1 mm^3 demande le développement d'une circulation sanguine pour lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance (Auerbach et Auerbach, 1994; Fidler et Ellis, 1994; Folkman, 1986). Les cellules tumorales, qui sont en condition d'hypoxie, vont sécréter divers facteurs angiogéniques impliqués dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales avoisinantes (Yance et Sagar, 2006). Ceci permettra d'enclencher le processus de néovascularisation. Ce processus peut également être déclenché par d'autres signaux tels que le stress métabolique (pH faible, hypoglycémie...) ou mécanique (pression engendrée par les cellules en prolifération), une réponse immunitaire ou inflammatoire (cellules immunitaires ou inflammatoires comme les mastocytes et les macrophages qui ont infiltré le tissu) ainsi que des mutations géniques (activation ou délétion de gènes tumoraux impliqués dans la régulation de l'angiogenèse) (Bergers et Benjamin, 2003).

2.4 Mécanismes de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse, tant tumorale que normale, peut se séparer au plan cellulaire en trois événements principaux : le bourgeonnement (« sprouting »), l'intussusception et la septation (Carmeliet, 2000). Le bourgeonnement est caractérisé par l'activation des cellules endothéliales, ce qui conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire avoisinante (Folkman, 2003b; Hendrix et al., 2003). Ceci permet la migration orientée des cellules endothéliales, suivie de leur prolifération et de leur différenciation en structure capillaire (Folkman, 2003b; Hendrix et al., 2003). L'intussusception est définie comme étant un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés (Carmeliet, 2000), alors que la septation se caractérise par la création de canaux vasculaires séparés à l'intérieur des vaisseaux suite à la croissance des cellules endothéliales (Carmeliet, 2000). Le processus angiogénique permettra ainsi la formation d'un réseau vasculaire nécessaire au développement de la tumeur.

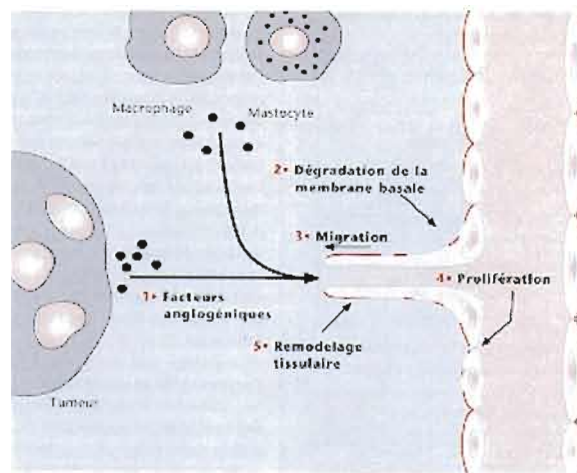


Figure 3 : Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. 1) Tout d'abord il y aura initiation de l'angiogenèse suite à un stimulus angiogénique local. Ce stimulus permettra d'entraîner les cellules endothéliales dans la cascade angiogénique. 2) Il y aura par la suite dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. 3) Les cellules endothéliales pourront alors migrer dans l'espace périvasculaire vers les stimuli angiogéniques. 4) Les cellules endothéliales proliféreront et migreront. 5) Les cellules endothéliales se différencieront et s'organiseront en tube pour former un nouveau capillaire. Enfin, elles sécrèteront les composantes de la membrane basale ainsi que des facteurs de croissance qui contribueront au remodelage tissulaire. (Figure tirée du site Internet : www.uquebec.ca/mag/mag98_11/report.html)

Le bourgeonnement, qui est le mécanisme le plus étudié de l'angiogenèse, se caractérise par plusieurs étapes. Il est initié par un stimulus angiogénique qui entraîne une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux adjacents (Distler et al., 2002). Ceci se fait par la dissolution des jonctions d'adhésion (Distler et al., 2002). Par la suite la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire avoisinante permet la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Sawaya et al., 1998). Les cellules migrantes vont alors former de fins prolongements cytoplasmiques (Pepper, 1997). Elles pourront s'allonger et s'aligner les unes avec les autres pour former un bourgeon capillaire (Pepper, 1997). La division des cellules endothéliales permettra d'augmenter la longueur du bourgeon capillaire (Pepper, 1997). Après avoir migré et proliféré, les cellules endothéliales s'assemblent en tubes et forment un lumen (Milkiewicz et al., 2006). Cet assemblage en tubes par les cellules endothéliales permet la formation de vaisseaux primitifs. Le processus

de maturation permet à certains de ces vaisseaux de devenir des capillaires, suite à une différenciation et une apposition des cellules mésenchymateuses spécialisées (les péricytes), alors que la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses permettra de transformer ces vaisseaux primitifs en artères et en veines (Lai et Kuo, 2005; Pepper, 2000).

Au plan moléculaire, le processus angiogénique est finement contrôlé par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales ou tumorales (Yance et Sagar, 2006). Dans les tissus sains, il existe un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Ces derniers sont sous-exprimés, surexprimés ou dérégulés dans les processus tumoraux ce qui permet d'induire une angiogenèse excessive (Yance et Sagar, 2006).

Parmi les molécules importantes pour la régulation de l'angiogenèse, notons le facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*, FGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), les angiopoïétines et les métalloprotéases de la matrice (*matrix metalloproteinases*, MMPs) (Papetti et Herman, 2002; Yance et Sagar, 2006). En conditions physiologiques normales, l'activité de ces molécules est soumise à une régulation extrêmement fine. Les intégrines jouent également un rôle considérable dans le processus angiogénique en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire (Lakka et al., 2005).

2.5 Les métalloprotéases de la matrice

La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, nécessaire lors du processus angiogénique, se fait principalement par les MMPs (Sawaya et al., 1998). En plus de leurs rôles dans l'angiogenèse, les MMPs sont requises lors de l'invasion tumorale et du processus métastatique de plusieurs tumeurs malignes, incluant les GBM (Nakagawa et al., 1994; Rooprai et McCormick, 1997). Les MMPs jouent également un rôle dans des processus

physiologiques normaux en remodelant la matrice extracellulaire et en permettant le renouvellement des tissus (Kachra et al., 1999).

Ces enzymes sont des protéinases neutres codées par une famille de gènes multiples (Kachra et al., 1999). Elles possèdent toutes une structure similaire et leur activité est dépendante d'un atome de zinc (Malemud, 2006). En effet, leur domaine catalytique contient un ion zinc (Malemud, 2006). De plus, les membres de cette famille d'enzymes ont un prédomaine correspondant au peptide signal de sécrétion et un prodomaine qui est enlevé lorsque les protéases sont activées par clivage (Sanchez-Lopez et al., 1988). Ces protéases ont traditionnellement été classées selon leurs affinités pour les substrats en quatre catégories (Mignatti et Rifkin, 1996) (Tableau 2): premièrement les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) qui clivent les fibrilles de collagène (Mignatti et Rifkin, 1996), deuxièmement les collagénases de type IV (MMP-2 et MMP-9) qui dégradent le collagène, la gélatine et l'élastine des membranes basales (Mignatti et Rifkin, 1996), troisièmement les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) qui dégradent les protéoglycanes, la fibronectine, la laminine, la gélatine et les protéines globulaires du collagène de type IV (Mignatti et Rifkin, 1996), quatrièmement les MMPs membranaires (MT-1, MMP-15, MMP-16 et MMP-17) qui sont ancrées à la surface cellulaire par un domaine transmembranaire situé dans la partie COOH terminale (Mignatti et Rifkin, 1996). Excepté les MMPs membranaires, les autres membres de cette famille sont solubles.

Les collagénases de type IV sont sécrétées sous forme de zymogènes et sont activées par clivage de la partie amino-terminale (Chintala et al., 1999). Elles sont cruciales pour l'angiogenèse. Ces MMPs sont impliquées dans la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration des cellules endothéliales vers les stimuli angiogéniques (Ray et Stetler-Stevenson, 1994). Ces enzymes sont également importantes pour l'activation de facteurs angiogéniques comme le *basic* FGF (van Hinsbergh, Koolwijk, et Hanemaaijer, 1997). De plus, MMP-2 et MMP-9 ont un rôle significatif dans l'invasion tumorale et le caractère malin des gliomes tel qu'indiqué par la corrélation entre le niveau d'expression de ces collagénases et le grade de ces tumeurs (Rao et al., 1993; VanMeter et al., 2001).

Tableau 2 : Les différentes classes de métalloprotéases de la matrice ainsi que la liste non exhaustive de leurs substrats.

Type de MMPs	Substrats
<u>Collagénases interstitielles</u> MMP-1 MMP-8 MMP-13	Fibrilles de collagène, fibronectine
<u>Collagénases de type IV</u> MMP-2 MMP-9	Collagène, gélatine et élastine des membranes basales
<u>Stromélysines</u> MMP-3 MMP-10 MMP-11	Protéoglycanes, fibronectine, laminine, gélatine et protéines globulaires du collagène de type IV
<u>MMPs membranaires</u> MT-1 MMP-15 MMP-16 MMP-17	Collagènes (type I, II et III), gélatine, fibronectine, tenascine, vitronectine, laminine

2.6 L'invasion et la formation des métastases

L'invasion tumorale permet de distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. En effet, contrairement aux tumeurs malignes, les tumeurs bénignes n'envahissent pas les tissus voisins. L'invasion par les cellules malignes nécessite une dégradation de la membrane basale (composée notamment de collagène de type IV) et de la matrice extracellulaire (Chintala et al., 1999; Lakka et al., 2005). Cette dégradation se fait principalement à l'aide des collagénases MMP-2 et MMP-9 ainsi que MT1-MMP (Brown et al., 1993; Chintala et al., 1999; Forsyth et al., 1999). Tel qu'il a été mentionné, des études ont montré qu'il existe une corrélation très nette entre le pouvoir invasif des cellules malignes et la présence d'activité collagénase IV dans les tumeurs (Rao et al., 1993; VanMeter et al., 2001).

La pénétration des cellules tumorales dans la circulation sanguine mène à la formation de métastases (Pepper, 2000). Ces dernières proviennent de la croissance d'une cellule tumorale à distance du site où se trouve la tumeur initiale ou primaire. Lorsque les cellules cancéreuses diffusent pour former une nouvelle tumeur, elles acquièrent de nouvelles caractéristiques, incluant le potentiel de migration et d'invasion ainsi que la perte d'adhésion cellulaire (Arya et al., 2006). Ceci leur permet de passer du phénotype cancéreux à métastatique (Arya et al., 2006). La tumeur qui en résultera est dite secondaire ou métastatique.

La formation et la dissémination de métastases est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes (Hart, Goode, et Wilson, 1989; Liotta et Stetler-Stevenson, 1991). Suite à la vascularisation de la tumeur, certaines cellules malignes vont se séparer de la tumeur primaire et s'attacher à la matrice extracellulaire (Hart et al., 1989; Liotta et Stetler-Stevenson, 1991). Elles vont alors dégrader les protéines de la matrice pour atteindre le système lymphatique ou sanguin (Hart et al., 1989; Liotta et Stetler-Stevenson, 1991).

Plus l'environnement de la tumeur primaire sera vascularisé, plus le pronostic sera défavorable et plus les probabilités de voir apparaître des métastases seront élevées (Weidner, 1995). En effet, une augmentation de l'angiogenèse tumorale favorise la pénétration des

cellules malignes dans la circulation sanguine, menant ainsi au développement métastatique (Noel et al., 2004).

2.7 Thérapie anti-angiogénique

Un nouvel axe thérapeutique, dit anti-angiogénique, est récemment apparu dans le traitement du cancer (Folkman, 2003). Puisqu'il est maintenant bien établi que le développement d'une vascularisation est un événement clef dans le processus tumoral, autant pour la croissance des tumeurs que pour leur dissémination métastatique par la voie sanguine, cibler le réseau vasculaire qui irrigue la tumeur semble une stratégie anti-cancéreuse prometteuse (Folkman, 2003). Cette stratégie de traitement offre un vaste champ d'application puisque la plupart des cancers sont dépendants de l'angiogenèse pour leur développement et leur survie.

Il existe deux types d'inhibiteurs de l'angiogenèse : les inhibiteurs directs et les inhibiteurs indirects. Jusqu'à présent, la plupart des essais cliniques ont été réalisés avec des inhibiteurs directs (Cao et al., 2004). Ces derniers entravent la prolifération des cellules endothéliales, leur migration ou leur différenciation (Cao et al., 2004). Les inhibiteurs indirects, quant à eux, interfèrent avec des ligands angiogéniques, leurs récepteurs ou leur voie de signalisation (Cao et al., 2004).

La stratégie thérapeutique anti-angiogénique semble présenter de nombreux avantages en comparaison des thérapies conventionnelles. Par exemple, comme elle cible les cellules endothéliales engagées dans la formation des néo-vaisseaux tumoraux, qui sont des cellules stables au point de vue génétique, il y a un risque plus faible de développer des mécanismes de résistance aux agents utilisés (Yance et Sagar, 2006). Son action est également indépendante de la très grande variété phénotypique et génotypique qui caractérisent les cellules tumorales (Yance et Sagar, 2006). Qui plus est, chez l'adulte sain, les cellules endothéliales sont en majorité quiescentes. Ainsi, un traitement anti-angiogénique ciblerait principalement les cellules endothéliales en prolifération de la tumeur, ce qui permettrait de limiter considérablement la toxicité de ce type de traitement (Feron, 2004). De plus, ces

cellules sont facilement accessibles car elles sont en contact direct avec la circulation sanguine (Feron, 2004). Enfin, la réduction de la vascularisation tumorale permettrait également de diminuer les risques de dissémination métastatique (Feron, 2004).

La validation clinique de ce type de thérapie commence à être démontré. Ainsi, la FDA (*US Food and Drug Administration*) a déjà approuvé aux Etats-Unis l'utilisation d'agents anti-angiogéniques tels que le Bevacizumab (ou Avastine), le Tarceva et le Macugène pour le traitement des cancers colorectaux et du poumon ainsi que de la dégénérescence maculaire (Folkman, 2006). De plus, la thalidomide et l'endostatine sont également utilisées en Australie et en Chine pour le traitement de myélome multiple et du cancer du poumon (Folkman, 2006).

Par ailleurs, ces études cliniques ont montré que la thérapie anti-angiogénique ne permet pas à elle seule d'éradiquer complètement les tumeurs (Ferrara et Kerbel, 2005). Cependant, plusieurs études pré-cliniques ont montré que la co-administration d'agents anti-angiogéniques aux thérapeutiques cytotoxiques permettait d'augmenter l'effet anti-tumoral global du traitement (Ferrara et Kerbel, 2005). Ainsi, la thérapie anti-angiogénique pourrait être complémentaire aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie conventionnels.

CHAPITRE III

LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE

3.1 La barrière hémato-encéphalique

Les cellules endothéliales formant les capillaires cérébraux permettent la formation de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, en plus de leur fonction dans l'angiogenèse, ces cellules jouent un autre rôle dans le développement des tumeurs cérébrales. En effet, la présence de la BHE permet aux tumeurs intracrâniennes de se développer dans un sanctuaire anatomique protégé de l'action des médicaments, limitant ainsi l'efficacité des traitements des tumeurs cérébrales (Fromm, 2004; Lin, 2004). En conséquence, la mise au point de stratégies permettant de traverser la BHE ou encore le développement d'agents thérapeutiques pouvant atteindre le tissu cérébral sont devenus des impératifs de l'industrie pharmaceutique (Begley, 2004).

3.2 Historique

L'existence de la BHE, que l'on nomme également barrière sang-cerveau, a été observée pour la première fois il y a plus de cent ans par Paul Ehrlich et Edwin Goldman (Bechmann, Galea, et Perry, 2007; Ribatti et al., 2006). Ces derniers remarquèrent que suite à une injection intraveineuse de colorant (le bleu de trypan), tous les tissus, à l'exception du cerveau, étaient teintés (Bechmann et al., 2007; Ribatti et al., 2006). Par la suite, Edwin Goldman observa qu'en injectant le même colorant dans le liquide céphalorachidien, le cerveau était coloré mais que ce colorant ne parvenait pas jusqu'à la circulation sanguine (Bechmann et al., 2007; Ribatti et al., 2006). Ceci fut la première démonstration que le système nerveux central (SNC) était séparé du sang par une barrière.

3.3 Propriétés physiques et biochimiques de la barrière hémato-encéphalique

Le réseau de capillaires sanguins formant la BHE est estimé à 650 Km chez l'humain (Dohrmann, 1970). De plus, la surface de l'endothélium des vaisseaux cérébraux qui forme cette barrière est évaluée à 20 m² (Dohrmann, 1970). Au plan microscopique, les cellules endothéliales qui forment les capillaires cérébraux présentent des propriétés différentes de celles formant les vaisseaux des autres organes. D'une part, ces cellules sont soudées entre elles par des jonctions serrées et présentent très peu de vésicules d'endocytose (Cecchelli et al., 1999). D'autre part, les capillaires cérébraux ne sont pas fenêtrés (Cecchelli et al., 1999). Ces caractéristiques permettent à la BHE d'être imperméable à de nombreuses substances véhiculées par le sang.

Le développement et le maintien de l'intégrité de la BHE dépendent des cellules endothéliales mais également de la membrane basale, des astrocytes et des péricytes (Demeule et al., 2004). La membrane basale, qui est notamment composée de collagène, va servir de support aux cellules endothéliales (Demeule et al., 2004). Les péricytes, qui sont présents au pourtour des capillaires cérébraux, participeraient à l'angiogenèse et à la différenciation des cellules endothéliales de la BHE (Loscher et Potschka, 2005; Pepper, 2000). Cependant, leurs fonctions sont peu étudiées. Les astrocytes, quant à eux, jouent un rôle dans l'établissement des jonctions serrées qui soudent les cellules endothéliales entre elles (Haseloff et al., 2005).

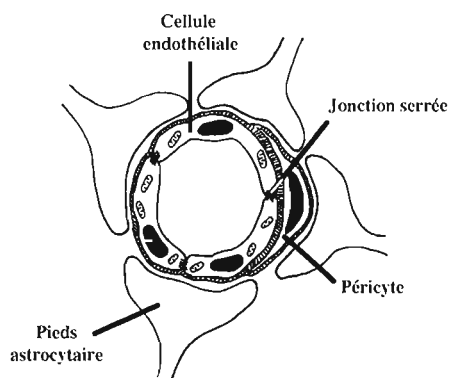


Figure 4 : Section d'un capillaire cérébral.

3.4 Les systèmes de transport de la barrière hémato-encéphalique

Tel qu'il a été mentionné, la présence de la BHE limite l'entrée de la majorité des molécules dans le SNC (Bickel, Yoshikawa, et Pardridge, 2001; Pardridge, 1999). Toutefois, certaines molécules arrivent à passer du sang vers le cerveau. Elles peuvent y parvenir de trois façons différentes : en empruntant la voie paracellulaire, en utilisant des transporteurs ou par diffusion (transcytose) (Loscher et Potschka, 2005; Pardridge, 1999).

La présence des jonctions serrées limite la voie paracellulaire qui est normalement empruntée par les petites molécules hydrophiles (Demeule et al., 2004). Les petites molécules lipophiles, de moins de 600 Daltons, peuvent quant à elles diffuser à travers la BHE (Loscher et Potschka, 2005). Au-delà de cette taille, le passage des molécules essentielles vers le cerveau, comme le glucose et les acides aminés, est assuré par la présence de récepteurs et transporteurs spécifiques (Kusuhara et Sugiyama, 2001; Pardridge, 1999; Tsuji et Tamai, 1999).

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux expriment également des transporteurs à efflux. Ces derniers vont diminuer le passage de plusieurs molécules potentiellement toxiques à travers la BHE (Beaulieu et al., 1997; Miller et al., 2000). L'action de ces transporteurs, comme la P-glycoprotéine (P-gp) et les MRPs (*Multidrug resistance-associated protein*), vont ainsi permettre de maintenir l'homéostasie cérébrale (Beaulieu et al., 1997; Miller et al., 2000).

3.5 La P-glycoprotéine

Tel qu'il a été mentionné, la diffusion passive permet aux petites molécules lipophiles de traverser la BHE (Loscher et Potschka, 2005). Or la P-gp, qui est exprimée du côté luminal des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Beaulieu et al., 1997), va permettre de recapter une partie de ces molécules et de les expulser dans la circulation sanguine, limitant ainsi leur accès au cerveau (Fromm, 2004; Lin, 2004).

La P-gp est une protéine transmembranaire de 170 kDa liant l'ATP (adénosine triphosphate) membre de la famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette) (Biedler et Riehm, 1970; Ling et Thompson, 1974). Elle est produite par les gènes MDR. Chez l'homme, on retrouve deux isoformes de cette protéine (MDR1 et MDR2), alors que chez les muridés il en existe trois (*mdr1*, *mdr2* et *mdr3*) (Bendayan, Lee, et Bendayan, 2002; Jette et al., 1995). Seuls MDR1, ainsi que *mdr1-3* chez la souris, sont impliqués dans la résistance pléiotropique aux médicaments. Chez l'homme, l'isoforme produit par le gène MDR2 joue plutôt un rôle dans le transport de la phosphatidylcholine au niveau des hépatocytes (Ruetz et Gros, 1994; Smit et al., 1993). Afin de clarifier le texte, les isoformes impliqués dans le phénotype de résistance pléiotropique aux médicaments (*multidrug resistance*, MDR) sont appelés P-gp.

Parmi les substrats de la P-gp, mentionnons les agents anti-cancéreux (vinblastine, étoposide, doxorubicine, etc.), les inhibiteurs des canaux calciques, les hormones, les stéroïdes, les immunosuppresseurs, les inhibiteurs de protéases, les médicaments cardiovasculaires et anti-épileptiques, les antihistaminiques, les antibiotiques, les détergents, les cytokines, les antifongiques et autres (Jodoin, Demeule, et Beliveau, 2002; Loscher et Potschka, 2005). Ces substrats de la P-gp, qui possèdent diverses structures et fonctions, sont généralement hydrophobiques et d'origine naturelle (Jodoin, Demeule, et Beliveau, 2002).

En plus d'être exprimée au niveau de la BHE, la P-gp est également présente dans d'autres tissus sains, comme les reins, les glandes surrénales, les poumons, le foie, l'intestin et la barrière placentaire (Fromm, 2004; Loscher et Potschka, 2005). Elle y joue un rôle de protection et de détoxification cellulaire contre les composés amphiphiles (Loscher et Potschka, 2005).

La P-gp est aussi exprimée par les cellules cancéreuses, leur conférant le phénotype MDR (Biedler et Riehm, 1970; Dano, 1973). En agissant comme une pompe transmembranaire, la P-gp empêche les médicaments de s'accumuler à l'intérieur des cellules tumorales en transportant ceux-ci à l'extérieur de la cellule. Elle diminue ainsi grandement l'efficacité des traitements de chimiothérapie en réduisant la cytotoxicité des agents utilisés (Endicott et Ling, 1989; Gottesman et Pastan, 1993). Le phénotype MDR permet aux cellules cancéreuses

de devenir résistantes, non seulement aux médicaments auxquels elles sont exposées, mais également à tous les substrats de la P-gp (Ling et Thompson, 1974).

CHAPITRE IV

LA NUTRATHÉRAPIE ET LA CURCUMINE

4.1 Nutrathérapie

Les principales approches actuellement utilisées pour traiter le cancer sont l'excision des tumeurs par la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Fujimaki, 2005). Malheureusement, ces approches sont très invasives et très éprouvantes pour le patient autant au niveau physique que psychologique (Heber, Blackburn, et Go, 1999). De plus, l'utilisation d'agents de chimiothérapie entraîne de nombreux effets secondaires provoqués par la toxicité de ces médicaments envers les cellules saines de l'organisme.

Afin de diminuer les effets secondaires reliés aux thérapies anti-cancéreuses et d'augmenter leur efficacité, de nouveaux axes de recherche dans le traitement du cancer ont vu le jour. Parmi ceux-ci, la nutrathérapie. Le concept de nutrathérapie est né suite à l'observation, sur des modèles cellulaires et animaux, que certaines molécules isolées d'aliments permettaient de provoquer la mort de cellules tumorales et de freiner le développement de plusieurs cancers (Park et Pezzuto, 2002; Sharma et al., 1994). Par définition, la nutrathérapie est l'utilisation de molécules anti-cancéreuses présentes de façon naturelle dans les aliments comme agent anti-cancéreux afin d'éviter le développement ou la progression tumorale.

Ce nouvel axe de recherche possède l'avantage de réduire les effets secondaires néfastes puisqu'il utilise des aliments ayant été sélectionnés depuis longtemps par l'humain comme étant bénéfiques pour sa santé (Dorai et Aggarwal, 2004). De plus, les molécules provenant d'aliments naturels peuvent être utilisées quotidiennement pour contrer le développement du cancer puisqu'elles sont considérées comme étant pharmacologiquement sécuritaires. En comparaison, les médicaments synthétiques ne permettent pas leur utilisation en prévention étant donné leur toxicité (Dorai et Aggarwal, 2004).

4.2 Les composés phytochimiques

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et de légumes, de thé, de vin rouge, ainsi que de certaines épices était associée à une baisse importante du risque de développer le cancer (Dorai et Aggarwal, 2004). Des données expérimentales, provenant de modèles cellulaires et animaux, corroborent ce fait (Sharma et al., 1994). Cette action anti-cancéreuse est due à la présence, dans ces aliments, de composés phytochimiques tels que les polyphénols (curcuminoïdes, flavonoïdes et catéchines), les composés sulfurés (isothiocyanates et diallyl sulphides), les terpènes (caroténoïdes et monoterpènes) et les saponines (triterpénoïdes et stéroïdes) (Dorai et Aggarwal, 2004; Sharma et al., 1994; Stoner et Mukhtar, 1995). Les composés phytochimiques peuvent agir à plusieurs niveaux contre le cancer afin de prévenir son développement ou éviter que celui-ci ne progresse à un stade plus avancé. Ils peuvent présenter une cytotoxicité sur les cellules tumorales, avoir une action anti-angiogénique ou alors moduler la réponse immune (Dorai et Aggarwal, 2004). Ils peuvent également augmenter l'absorption intestinale ou inhiber le métabolisme hépatique d'autres molécules, y compris celui de certains médicaments (Dorai et Aggarwal, 2004). Certains composés phytochimiques sont actifs à plusieurs de ces niveaux.

Les catéchines du thé vert, la génistéine du soja, la curcumine contenue dans le curcuma, le diallyl sulfide contenu dans l'ail, l'acide éllagique des fraises, la delphinidine des bleuets, le lycopène des tomates, le resvératrol contenu dans les raisins et le sulforaphane présent dans le brocoli sont parmi les molécules phytochimiques qui ont été étudiées et qui présentent un effet anti-cancéreux (Dorai et Aggarwal, 2004; Kelloff et al., 2000).

4.3 Le curcuma et la curcumine

Le curcuma provient du rhizome séché et broyé d'une plante de la famille des Zingibéracées (Araujo et Leon, 2001). Cette plante herbacée, *Curcuma longa*, est cultivée en Inde, en Chine, à Taiwan, au Japon, au Myanmar, en Indonésie et en Afrique (Araujo et Leon, 2001). L'Inde est le plus grand producteur et le plus grand consommateur de curcuma au monde

(Araujo et Leon, 2001). Les Chinois et les Arabes l'emploient également depuis longtemps (Belakavadi et Salimath, 2005; Govindarajan, 1980). Par contre, en Occident, en dehors de ses usages médicaux et tinctoriaux, son emploi n'a jamais été très répandu (Belakavadi et Salimath, 2005; Govindarajan, 1980).



Figure 5 : Illustrations de *Curcuma longa*, la plante d'où est extrait le curcuma, de sa racine et de l'épice. Le curcuma provient d'une plante herbacée rhizomateuse de la famille des Zingibéracées (illustration de gauche). Son rhizome (illustration en haut à droite) est séché et réduit en poudre pour donner le curcuma (illustration du bas à droite). (Figure tirée du site Internet : <http://newsletter.vitalchoice.com>)

Le curcuma est une épice qui fait l'objet d'échanges commerciaux depuis tellement longtemps qu'on ne peut déterminer avec certitude son origine. On pense cependant qu'il vient du Sud ou du Sud-Est de l'Asie, peut-être plus spécifiquement de l'Inde, d'où il se serait répandu dans toute l'Asie, de même qu'au Proche et au Moyen-Orient il y a des milliers d'années (Belakavadi et Salimath, 2005; Govindarajan, 1980).

Son emploi, en Asie, en Afrique et au Proche et Moyen-Orient, remonte à plus de 4000 ans (Belakavadi et Salimath, 2005; Govindarajan, 1980). Dès cette époque, le curcuma est utilisé en tant qu'épice, mais aussi comme agent de coloration de plusieurs aliments, tels que le cari

et la moutarde, de même que dans la production de cosmétiques, de teintures et de médicaments (Ammon et al., 1992; Araujo et Leon, 2001; Heber et al., 1999).

La couleur jaune du curcuma provient d'un mélange de pigments phénoliques, les curcuminoïdes, dont la curcumine fait partie. La teneur en curcuminoïdes dans la poudre de curcuma est d'environ 5% (Maheshwari et al., 2006). Ce mélange de composés phénoliques se compose de 70 à 75% de curcumine, de 15 à 20% de diméthoxycurcumine et de 3 à 5% de bisdiméthoxycurcumine (Maheshwari et al., 2006). De ces trois curcuminoïdes, c'est la curcumine qui présente les propriétés pharmacologiques les plus intéressantes.

4.4 Vertus médicinales de la curcumine

Dans la médecine indienne traditionnelle, le curcuma est employé comme remède contre la toux, les désordres biliaires, l'anorexie, les plaies des diabétiques, les désordres hépatiques, le rhumatisme et les sinusites (Shishodia, Sethi, et Aggarwal, 2005). Plus récemment, des études, effectuées *in vitro* et *in vivo*, ont montré que la curcumine possédait des activités biologiques intéressantes pour la santé humaine incluant un effet anti-oxydant, anti-inflammatoire et anti-microbien (Maheshwari et al., 2006). Ce produit naturel a également été démontré pour inhiber la croissance de plusieurs lignées tumorales *in vitro* et d'empêcher la tumorigenèse *in vivo* (Duvoix et al., 2005). De plus, ce composé présente des effets anti-cancéreux en empêchant l'initiation tumorale par des carcinogènes et en réduisant la promotion du cancer induite par les esters de phorbol (Maheshwari et al., 2006). On a aussi décrit une action anti-angiogénique pour cette molécule (Arbiser et al., 1998) qui pourrait expliquer son effet chimiopréventif au niveau de la promotion tumorale (Duvoix et al., 2005).

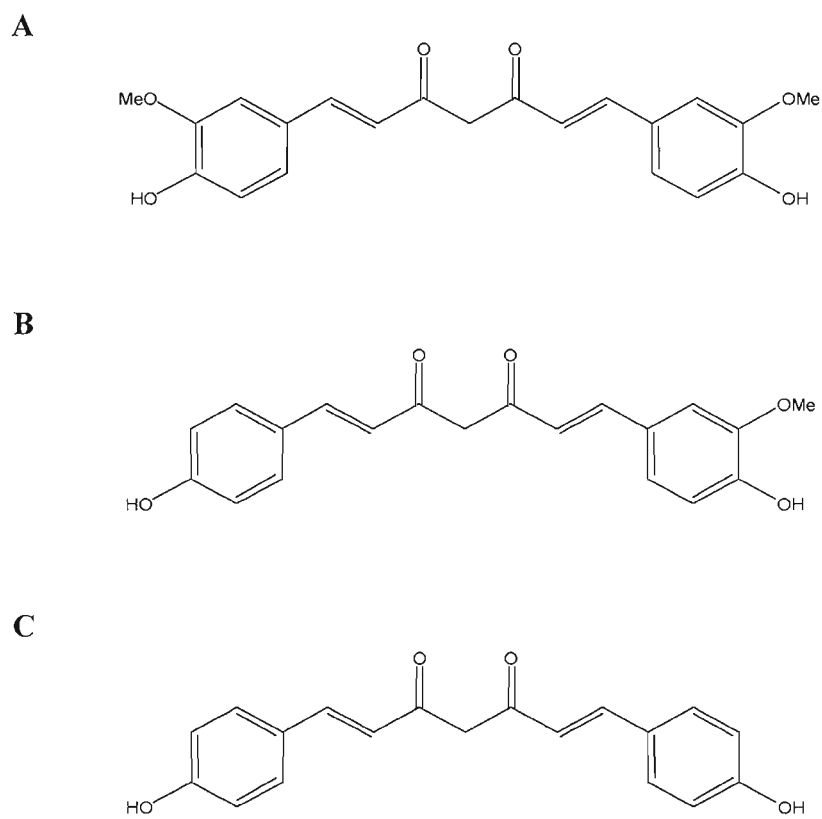


Figure 6 : Structure moléculaire des curcuminoïdes. A) La curcumine [1,7-bis (-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6 heptadiène -3,5 dione] (ou diféruloylméthane) est une molécule contenant deux noyaux phénoliques identiques séparés par une courte chaîne d'hydrates de carbone. Sa structure est symétrique et contient deux fonctions cétone, deux fonctions alcool et deux fonctions éther ; **B)** diméthoxycurcumine (une fonction éther de moins que la curcumine) ; **C)** bisdiméthoxycurcumine (deux fonctions éther de moins que la curcumine).

CHAPITRE V

PROJET DE RECHERCHE

5.1 Présentation du projet de recherche

Plusieurs études récentes, réalisées majoritairement *in vitro* sur des lignées tumorales en culture, ont montré que la curcumine possède de remarquables propriétés anti-cancéreuses (Aggarwal, Kumar, et Bharti, 2003). De plus, on a démontré par des essais cliniques une absence de toxicité pour des doses allant jusqu'à 10 g/jour (Aggarwal et al., 2003). Ces données suggèrent que la curcumine possède un fort potentiel pour la prévention et la thérapie du cancer. Qui plus est, cette épice semble avoir des propriétés anti-angiogéniques. Comme les tumeurs cérébrales sont parmi les types de cancers les plus vascularisés, il semblait intéressant de vérifier l'utilisation de la curcumine en tant qu'agent thérapeutique dans le traitement du cancer du cerveau.

Dans le cadre de cette étude, le potentiel anti-tumoral et anti-angiogénique de la curcumine sur la croissance de tumeurs cérébrales *in vitro* et *in vivo* a été évalué. Cet ouvrage démontre pour la première fois la possibilité de l'utilisation de la curcumine comme agent dans la prévention et le traitement des glioblastomes. Les résultats de cette recherche pourraient donc ouvrir la voie à de nouvelles options thérapeutiques dans le traitement de ce type de cancer.

PARTIE B

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

Ma contribution personnelle pour l'article présenté dans cette partie se résume comme suit : j'ai réalisé la totalité de la partie expérimentale ainsi que la rédaction de l'article. Les implantations des cellules cancéreuses chez les souris athymiques ainsi que les soins apportés aux animaux ont été faits avec la participation de Normand Lapierre et du Dr Anthony Régina.

CHAPITRE VI

CURCUMIN INHIBITS TUMOR GROWTH AND ANGIOGENESIS IN GLIOBLASTOMA XENOGRAFTS.

MARIE-CLAUDE PERRY, MICHEL DEMEULE, ANTHONY RÉGINA, ROMÉO CECHELLI,
ROBERT MOUMDJIAN, ET RICHARD BÉLIVEAU.

ARTICLE EN SOUMISSION

Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts.

Marie-Claude Perry,¹ Michel Demeule,¹ Anthony Régina,¹ Roméo Cecchelli,² Robert Moumdjian,³ and Richard Béliveau^{1*}

¹Laboratoire de médecine moléculaire, Université du Québec à Montréal- Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada.

²Laboratoire Mixte Institut Pasteur de Lille, Université d'Artois, Lens, Cedex, France.

³Département de Neurochirurgie, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada.

*To whom correspondence should be addressed at Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Phone : (514) 987-3000 ext. 8551 ; Fax : (514) 987-0246 ; e-mail : oncomol@nobel.si.uqam.ca

Keywords: Curcumin; Glioblastoma; Anti-tumor; Anti-angiogenic; Blood-brain barrier

Abbreviations used: BBB, blood-brain barrier; BBCEC, bovine brain capillary endothelial cells; bFGF, basic fibroblast growth factor; FCS, fetal calf serum; i.p., intraperitoneal; MEM, minimum essential medium; MMP, matrix metalloproteinase; PBS, phosphate-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; RBE4, rat brain capillary endothelial cells; s.c., subcutaneous.

Abstract

Among the natural products shown to possess chemopreventive and anticancer properties, curcumin is one of the most potent. In the current study, we investigated the effects of this natural product on the growth of human glioma U-87 cells xenografted into athymic mice. The anti-proliferative effect of curcumin on U-87 cells was studied *in vitro* using [³H]-thymidine incorporation methods. Tumor size and animal survival time were followed in curcumin-treated mice bearing subcutaneous or intracerebral gliomas. Furthermore, *in vitro* migration and tube formation were assayed using the rat brain capillary endothelial cell line RBE4 to explore the effects of curcumin on angiogenesis. Curcumin was demonstrated to have anti-proliferative effects on U-87 cells in a dose-dependent manner ($IC_{50}=11.6\ \mu M$). In addition, curcumin administration (60 mg/kg/day) exerted significant anti-tumor effects on subcutaneous gliomas as demonstrated by slower tumor growth rate. Moreover, curcumin (120 mg/kg/day) affected intracerebral tumors prolonging significantly animal survival time. In the tube formation and cell migration assays using RBE4 cells, low doses of curcumin significantly inhibited formation of intact tube networks and reduced the number of migratory cells. *In vivo* experiments revealed that curcumin decreased the gelatinolytic activities of MMP-9. Furthermore, treatment with curcumin inhibited glioma-induced angiogenesis *in vivo*, as indicated by the concentration of hemoglobin in the subcutaneous tumors. We also demonstrate, using an *in vitro* model of blood-brain barrier (BBB), that curcumin can cross the BBB to a high level. These are the first results showing that curcumin suppresses tumor growth of gliomas in xenograft models. The mechanisms of the anti-tumor effects of curcumin were related, at least partly, to the inhibition of glioma-induced angiogenesis.

Introduction

Over the past decade, the incidence of primary brain tumors has rapidly increased [1]. In the U.S., 18,000 patients are diagnosed with malignant primary brain tumors each year [2]. More than half of them have glioblastoma multiforme, the most common type of malignant brain tumor in adults [2]. Despite advances in neurosurgical techniques and in radiation and drug therapies, glioblastoma multiforme have retained their dismal prognoses [3]. Surgery and radiation are limited by the infiltration of tumor cells into healthy brain [4], leading to relapse even after treatment [5]. Adjuvant chemotherapy is thus essential for the treatment of glioblastoma multiforme. However, the BBB restricts the brain entry of many anticancer agents [6]. Therefore, novel agents able to traverse the BBB are needed in the development of a successful strategy for the treatment of brain tumor.

Because of their smaller side effects compared to conventional treatment, there is increasing interest in the use of plant-derived chemicals that exhibit anti-tumor activity to combat human cancer. Curcumin, a natural phenolic compound found in the rhizomes of *Curcuma longa* (turmeric), gives specific flavor and color to curry. Turmeric is widely used in traditional Indian medicine to cure biliary disorders, anorexia, cough, diabetic wounds, hepatic disorders, rheumatism and sinusitis [7]. More recently, curcumin has been reported to display a series of biological activities important to human health, including antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial effects [8]. This natural product has also been demonstrated to efficiently induce growth inhibition and apoptosis in various cancer cell lines *in vitro* as well as decreased tumorigenesis *in vivo* [9]. Furthermore, this natural product inhibits both tumor initiation by some carcinogens and the tumor promotion induced by phorbol esters [8]. This polyphenolic compound has also been described as having anti-angiogenic activity [10].

Attempts to develop new, effective approaches for the prevention and treatment of cancer have lately focused on angiogenesis. Angiogenesis, a process that leads to the formation of new blood vessels from preexisting vascular networks, is a multistep process that occurs normally during a number of physiological processes, such as wound healing, embryogenesis and in the female reproductive system [11]. It also occurs in pathologic processes including

arthritis, diabetes and cancer [12]. Tumor growth, tumor invasion and metastasis are angiogenesis-dependent [13]. In order to develop, a tumor must continuously stimulate the growth of new capillary blood vessels to provide a source of nutrients and oxygen as well as to eliminate metabolic waste products. It is now well established that solid tumors must create their own new network of blood vessels in order to expand beyond 1-2 mm³ (neovascularization) [14]. Antiangiogenesis therapy is focussed on cutting off the blood supply of a tumor, an effect that may actually restrain or destroy the tumor itself.

Malignant gliomas are one of the most highly vascularized human cancers and the growth and survival of these tumors are dependent on an adequate blood supply [15]. In fact, the neovascularization of gliomas is correlated with their biological aggressiveness, degree of malignancy and clinical recurrence [16]. Moreover, microvessel density in gliomas has become one of the most important criteria for histological grading of the malignancy and for prediction of prognosis [17]. Thus, the inhibition of tumor angiogenesis could be an efficient therapeutic strategy for the prevention and treatment of this disease [18].

In the current study, we assess the *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity of curcumin against human glioma U-87 cells using either cell proliferation assay or nude mouse xenograft model. We also determined the effects of curcumin on the growth of subcutaneous (s.c.) gliomas before and after establishment of tumors. In the literature, there is no reports on the effect of curcumin on gliomas *in vivo*, and only a few reports on the effect of curcumin on the angiogenesis of cancer. Thus, in this study, experiments were performed to explore the effect of curcumin on angiogenesis by measuring the concentration of hemoglobin in tumors. We also studied curcumin passage across the blood-brain barrier using a well-established model of BBB, consisting of bovine brain capillary endothelial cells (BBCEC) co-cultured with newborn rat astrocytes [19]. This is the first report demonstrating the effects of curcumin on tumor growth and angiogenesis of gliomas *in vivo*. Our results confirm the potential utility of curcumin for both preventive and therapeutic applications in brain tumors.

Materials and methods

Chemicals:

Curcumin was purchased from LKT Laboratories (St. Paul, MN), whereas [^{14}C]sucrose (592 mCi/mmol) was provided by NEN (Boston, MA). Cell culture media were obtained from GIBCO BRL (Burlington, ON) and serum was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Type I collagen was extracted from rat tail tendons as previously described [20]. All other cell culture reagents and chemicals were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON), unless otherwise specified.

Cell culture:

The U-87 human glioma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 1 mM sodium pyruvate and 10% bovine calf serum. Rat brain capillary endothelial cells (RBE4) were kindly provided by Dr Françoise Roux (Université Paris 7, Paris, France). RBE4 cells were plated on type I collagen-coated plates (200 $\mu\text{g/mL}$) and maintained in α -MEM/Ham's F12 (1:1 v/v) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 30 mg/mL geneticin (GIBCO BRL), 50 mg/mL gentamycin and 100 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Isolation of bovine brain capillary endothelial cells, preparation of primary cultures of newborn rat astrocytes and the establishment of an *in vitro* model of the BBB were performed as previously described [21]. Briefly, BBCEC were plated onto culture plate inserts (Millicel PC, Millipore Corp., Bedford, MA) and set into twelve-well microplates containing astrocytes. The co-culture was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% of heat-inactivated calf serum, 10% heat-inactivated horse serum, 2 mM glutamine, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin, and 1 ng/mL bFGF. BBCEC formed a confluent monolayer after 7 days. Experiments were performed 5 to 7 days after confluence was reached. BBCEC were used directly on the insert for transcytosis studies. All cells were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air and routinely passaged when approximately 90% confluent.

***In vivo* studies in a subcutaneous glioma model:**

The *in vivo* chemopreventive and therapeutic effects of curcumin on U-87 derived xenografts were studied in athymic mice (CrI:CD-1 *nuBR*) from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Actively growing U-87 cells were harvested, washed with phosphate-buffered saline (PBS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} and resuspended in 1% methyl-cellulose in serum-free MEM at a density of 2.5×10^7 cells/mL. Athymic female mice received a subcutaneous injection of 2.5×10^6 cells, suspended in 100 μL methylcellulose solution, into the right flank. This tumor cell inoculum resulted in the growth of tumors in all experimental animals with a highly reproducible growth rate. To determine dose response, daily intraperitoneal (i.p.) treatment with curcumin (at 30, 60 and 120 mg/kg) or with vehicle alone was initiated on day 5 after tumor implantation into groups of five mice per treatment. To determine the effect of curcumin before and after brain cancer establishment, athymic mice received i.p. treatment with curcumin, (60 mg/kg) or with vehicle alone either 7 days before cell inoculation (to evaluate the chemopreventive effect of curcumin) or on day 3 after tumor implantation (to test the therapeutic effect of curcumin) into groups of seven mice per treatment. The injection was repeated daily until the animals were sacrificed. Curcumin was dissolved in corn oil and freshly prepared every day. When subcutaneous tumors had reached a well detectable size of 40 mm^3 , they were measured twice weekly, using a caliper, and volume was calculated by the formula: (length X width X height) until the end of the experiment. The body weights of the animals were recorded every 2 or 3 days. Mice were monitored daily for health status and when the control group tumor lengths exceeded 17 mm (Canadian Council on Animal Care recommended endpoint) all animals were killed. Subcutaneous tumor from U87 cells was confirmed postmortem in all mice. This protocol was evaluated and approved by the Institutional Committee for Good Animal Practices (UQAM, Montréal, QC).

Treatment efficacy:

Treatment efficacy was assessed in terms of curcumin's effects on the tumor volumes of treated mice relative to the tumor volumes of control mice. Tumor growth inhibition was calculated as the ratio of the median tumor volume in the treated group (T) versus the median tumor volume in the control group (C) : $\text{T/C \%} = (\text{median tumor volume of curcumin-treated})$

group on day Y / median tumor volume of control group on day Y) X 100. The optimal value, being the minimal T/C ratio, reflects the maximal tumor growth inhibition achieved [22].

Cell proliferation assay:

The effects of curcumin on U-87 and RBE4 cell proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation assay. Briefly, cells were seeded onto 24-well plates (5 X 10⁴ cells/well for U-87 and 3 X 10³ cells/well for RBE4), precoated with type-1 collagen for 1 h at 37°C for RBE4 cells. After 28 hours, cells were serum starved for 20 h, and then treated with various doses of freshly prepared curcumin, diluted in 0.1% DMSO (v/v) for an additional 48 h. Then 1 µCi/mL thymidine was added to each well and the cells were further incubated for 4 h. After this incubation period, cells were washed extensively with phosphate-buffered saline without Ca²⁺ and Mg²⁺, fixed in EtOH/acetic acid (3:1 v/v) for 10 minutes, rinsed with water, incubated with 10% trichloroacetic acid for 10 minutes three times, and collected after 1 h incubation at 75°C with perchloric acid (2N). The amount of [³H]-thymidine incorporated into the cells was measured with a liquid scintillation counter.

Cell migration assay:

Transwell migration of RBE4 was determined with a modified Boyden chamber assay. α-MEM/Ham's F12 media, with or without freshly prepared curcumin diluted in 0.1% DMSO (v/v) to the stated concentrations, was added to the lower chamber. Media was separated from the upper chamber by type I collagen precoated onto the lower surface of polycarbonate filters (8 µm pore size) from Costar (Corning, NY) at a concentration of 200 µg/mL for 2 h at 37°C. RBE4 were detached from culture flasks and suspended in FCS-free MEM/Ham's F-12 media at 5 X 10⁵ cells/mL. 200 µL of the RBE4 cell suspension, containing either curcumin or vehicle alone, was added to the upper chamber. Migration was carried out at 37°C in 5% CO₂ for 18 hours, after which the filters were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 20 minutes. After staining of the membranes with 0.1 % crystal violet / 20 % EtOH, the upper surface of the filter was scraped with a cotton swab. For each treatment, five images were captured and the number of cells having migrated onto the lower side of the filter was quantified using Northern Eclipse software.

Tube formation assay:

The tube formation assay was carried out using collagen as the extracellular matrix. The collagen gel was made as described by Hafny [23] by mixing 8 volumes of type I cold collagen (2 mg/mL) solution with 1 volume of ice cold 10X MEM and 1 volume sodium bicarbonate (22 mg/mL) containing 20 mM of HEPES buffer. 250 μ L of the collagen gel was dispensed into each well of a 24-well plate and allowed to gel at 37°C for an hour. The RBE4 were suspended in α -MEM/Ham's F12 and plated onto the collagen at a density of 4×10^4 cells/well. The cells were then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 16 hours. The culture medium was then removed, and 250 μ L of collagen gel were poured on top of the first collagen gel and polymerized for 10 minutes at 37°C. The fresh medium containing freshly prepared curcumin diluted in 0.1% DMSO (v/v), at the stated concentrations (or vehicle alone), were added and replaced every day. After the cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 3 days, each well was photographed and the tubular length of the cells was quantified in five different areas using the Northern Eclipse software.

Zymography assay:

Excised tumors were homogenized in five volumes of homogenate medium, composed of 250 mM sucrose and 10 mM Hepes-Tris pH 7.5, with a Polytron (Brinkman Instruments, Rexdale, ON) at 4°C. Their protein contents were determined using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL) and they were maintained as aliquots at -80°C until use. Substrate gel zymography of the activities of homogenates (20 μ g) from subcutaneous glioma tumors was performed with a Mini-Protein II apparatus from Bio-Rad, according to a method described previously [24]. The samples were resuspended in a sample buffer containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS and 0.00625% (w/v) bromophenol blue, then were agitated for 30 min at room temperature and loaded without boiling onto 7.5% acrylamide/bisacrylamide (29.2: 0.8) separating gels containing 0.1 (w/v) gelatin. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 110 V. After electrophoresis, the gels were soaked in 0.25% Triton X-100 (2 X 30 min) at room temperature and rinsed in NanoPure water. The gels were incubated at 37°C for 17 or 21 hours in an incubation buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ and 0.02% Brij-35. The

gels were then stained for 30 min in 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 in 30% methanol and 10% acetic acid, and destained in the same solution without the Coomassie blue dye.

***In vivo* angiogenesis assay:**

Angiogenesis was quantitated in tumors by measuring the concentration of hemoglobin. Briefly, the animals were sacrificed and the subcutaneous tumors were harvested, washed twice with PBS, immediately frozen and lyophilized overnight. After solubilization in 0.1% Triton X-100, the concentration of hemoglobin was determined directly by absorbance at 405 nm and compared with a standard curve of purified hemoglobin as previously described [25].

Transcytosis of curcumin:

The passage of curcumin across the BBB was measured in presence or absence of verapamil. During all experiment, apical-to-basal transport of [14 C]sucrose across monolayers of BBCEC cells was assessed to verify the integrity and the tightness of the barrier. Experiments were all performed at 37°C. On the day of the experiments, inserts containing confluent BBCEC co-cultured with astrocytes were gently washed with Ringer-HEPES buffer and were transferred into fresh 12-well plates containing 1 mL of Ringer-HEPES. In the upper chamber of each insert, 300 μ L of Ringer-HEPES containing freshly prepared curcumin (25 μ M) and 74.5 nM [14 C]sucrose (0.01 μ Ci), with or without verapamil (25 μ M), were added. At the end of the experiment (90 min), the apical-to-basolateral fluxes of curcumin and [14 C]sucrose across the BBCEC monolayer was evaluated. Permeability of the BBB was assessed by estimation of the passage of [14 C]sucrose with or without test compounds. In order to quantify the fluxes of curcumin, 500 μ L from the 1 mL of each lower chamber were taken and immediately lyophilized overnight. After solubilization in DMSO, the suspensions were centrifuged at 30,000 X g and the concentration of curcumin in the supernatant was determined directly by absorbance at 450 nm and compared with a standard curve. The endothelial permeability coefficient (Pe in cm/min) to [14 C]sucrose was calculated as described by Dehouck et al. [19].

***In vivo* studies in an intracranial glioma model:**

Intracranial tumors were induced by implanting U-87 cells into the brains of athymic female mice (7 mice per treatment group) by stereotactic surgery. The animals received 0.1 mg/kg of buprenorphine diluted in saline and were anesthetized by 120 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine. After making a midline sagittal incision in mice immobilized in a stereotactic apparatus, a burr hole was drilled. Tumor cells were injected into the right caudate-putamen (coordinates: 0.25 mm lateral, 0.15 mm anterior to the bregma, 0.35 mm below the dura) via a Hamilton syringe. The mice received an injection of 5×10^5 cells harvested as described above and suspended in 5 μ L of methyl-cellulose (0.5%). The injection was accomplished in 1 min, with the syringe remaining in place for 4 min. The syringe was then slowly withdrawn and the incision was sutured. Intraperitoneal treatment with curcumin (120 mg/kg/day or with vehicle alone) was initiated on day 1 after tumor implantation and the compound was dissolved as previously described. Animals were killed when they lost 20% of their body weight, which was monitored daily, or had difficulty ambulating, feeding or grooming. Intracranial tumor was confirmed postmortem in all mice that died. The Institutional Committee for Good Animal Practices (UQAM, Montréal, QC) approved this protocol.

Statistical analysis:

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons between two groups were performed using Student's t-test. The experiments were repeated with similar results at least thrice. Comparisons among multiple groups were performed using ANOVA whereas comparisons of survival curves were made using the log-rank test. Significance was accepted at a value of $p < 0.05$.

Results

Anti-tumor effects of curcumin on s.c. gliomas:

Tumors were induced in athymic nude mice by a subcutaneous inoculation of 2.5×10^6 U-87 human glioblastoma cells into the flank regions of the animals. We first investigated whether curcumin could exert significant anti-tumor effects on glioma xenografts. The initial dosing strategy for curcumin treatment with daily i.p. injections employed 30, 60 and 120 mg/kg (curcumin treatment was started at day 5 after tumor cell inoculation). The results indicated that treatment with 60 mg/kg/day of curcumin was more effective than treatment with the lower dose, as shown by the faster tumor growth rate in the former, whereas there was no significant difference in the animal tumor growth rate between the 60 and 120 mg/kg/day groups (Table I). Consequently, subsequent treatments were done with 60 mg/kg/day of curcumin.

In a second set of experiments, we evaluated the chemopreventive and therapeutic effects of curcumin on glioma xenografts. To test the chemopreventive effect of curcumin on tumorigenesis, we started the treatment 7 days before implantation of tumor cells whereas treatment with curcumin was started 3 days after tumor cell inoculation to evaluate the therapeutic effect. In the chemopreventive group, curcumin-treated mice had significantly smaller tumors than did the control mice from the beginning until the end of the experiment (Figure 1A). In addition, in the therapeutic group, curcumin-treated mice exhibited significantly smaller tumors than did the control mice between the 25th day and the end of the experiment (Figure 1B). The T/C values, which are used to determine tumor response, were similar between curcumin-treated mice in the chemopreventive group and in the therapeutic group at the end of the experiment (T/C values at the end of the treatment were 40.9% and 32.4%, respectively) (Table II). Overall, the results shown in Table II indicate that curcumin was able to significantly suppress the growth of gliomas tumors before and after the establishment of tumor growth.

No obvious side effects of curcumin treatment were observed throughout the course of our investigations. During the treatment period, the animals showed good activity with normal

food and water intake, and all mice demonstrated normal weight gain (data not shown), which indicated that mice tolerated the treatment well.

Anti-proliferative effects of curcumin on U-87 glioma cells and RBE4 brain endothelial cells:

To determine the impact of curcumin on the growth of human glioma xenografts, a proliferation assay was conducted on the U-87 glioma cell line and the RBE4 brain capillary endothelial cell line (Figure 2A). We evaluated the effect of curcumin on DNA synthesis capability by the thymidine incorporation method. Cells were exposed to different concentrations of curcumin for 48 h and were further incubated for 4 h with [³H]-thymidine. Our data indicate that curcumin exerted a significant antiproliferative effect upon both cell lines in a concentration-dependent manner. The concentrations of curcumin that inhibited 50% of cell proliferation (IC₅₀) were 11.6 ± 0.7 and 8.8 ± 0.2 μ M for U-87 and RBE4 cells, respectively. These results suggest that RBE4 cells are slightly but significantly more sensitive to curcumin as compared to U-87 cells (Student's t-test, $p < 0.05$). Our results indicated that curcumin might have an anti-angiogenic effect.

Inhibition of endothelial cell migration by curcumin :

To evaluate the anti-angiogenic activities of curcumin, we examined its effect on endothelial cell migration, which is an essential step in the angiogenic process. The cell migration assay was conducted using a modified Boyden chamber system and collagen-coated polycarbonate filters. The ability of curcumin to inhibit RBE4 migration toward a chemoattractive source (media with 10% serum) was determined by examining the number of cells that migrated onto the filter. RBE4 migration was blocked in a dose-dependent manner by curcumin with an IC₅₀ of 1.3 μ M, as shown in Figure 2B.

Inhibition of endothelial tube formation by curcumin:

The formation of tubular structures is another critical step in the angiogenesis process. We therefore investigated the effect of curcumin on the morphological differentiation of endothelial cells. In the tube formation assay, RBE4 were allowed to form tube cords in a three-dimensional collagen gel. The effect of curcumin was assessed after 72 h by measuring

the length of tube network created. As shown in Figure 2C, treatment of RBE4 with curcumin affected tube formation compared to the control. Curcumin treatment diminished the width and length of endothelial tubular structures in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 3.5 μ M (Figure 2C).

Inhibition of MMP activity *in vivo* by curcumin:

The release of matrix metalloproteinase (MMP) by endothelial cells represents an important step in neovascularization. For this reason, MMP activity was measured in tumor homogenates by gelatin zymography. After the staining and destaining of gels, the transparent bands observed in Figure 3A correspond to the gelatinolytic activity of pro- and MMP-9 present in the various samples (typical levels of gelatinolytic activity are shown). In curcumin-treated mice, the gelatinolytic activities of both pro-MMP-9 and MMP-9 were decreased compared to the control group whereas pro-MMP-2 and MMP-2 levels and activation were unaffected by curcumin (data not shown). Zymograms were scanned by laser densitometry to quantitate the levels of gelatinolytic activity inhibition caused by curcumin. In curcumin-treated mice, the enzymatic activities of pro-MMP-9 and MMP-9 were both reduced by 25% (Figure 3B). The latent and active forms of the enzymes present in s.c. tumors were affected similarly by curcumin.

Inhibition of glioma-induced angiogenesis *in vivo* by curcumin:

To determine whether curcumin could suppress blood vessel formation *in vivo*, we measured the concentration of hemoglobin in s.c. tumors. Tumors were induced in athymic nude mice and were excised and photographed 29 days later. In control mice, tumors appeared dark pink (Figure 4 A). However, in curcumin-treated mice, tumors were pale pink, indicating less blood vessel formation as compared to the control group (Figure 4A). To quantitate this effect, we measured the hemoglobin content of each tumor. Curcumin significantly inhibited the hemoglobin content (to 17.7 μ g/mg) compared to the control group (25.2 μ g/mg) (Figure 4B). These results suggest that curcumin is able to inhibit glioma-induced angiogenesis *in vivo*.

High transcytosis of curcumin across the BBB *in vitro*:

Since brain tumors are especially difficult to treat due to the lack of chemotherapeutic agent BBB transport or strong efflux through P-glycoprotein (P-gp), we investigated the passage of curcumin across the BBB *in vitro*. Transcytosis of curcumin, from the apical-to-basolateral surface of BBCEC monolayers co-cultured with astrocytes, was measured with or without verapamil, a known P-gp inhibitor (Figure 5). P-gp is believed to play an important role in brain protection at the BBB, by reducing drug penetration into the brain [26]. After 90 min, more than 80% of the initial quantity of curcumin had crossed through the BBCEC monolayers, indicating that curcumin could cross the blood-brain barrier to a high level. In addition, no significant augmentation in the transport of curcumin is observed in the presence of verapamil, suggesting that the transcytosis of curcumin is not affected by the presence of P-gp (Figure 5). We then examined the integrity of BBCEC monolayers in the presence of curcumin and verapamil by measuring the passage of [14 C]sucrose across BBCEC monolayers. Our results show that the passage of [14 C]sucrose across BBCEC is not affected by the presence of these agents (data not shown).

Anti-tumor effects of curcumin on the intracerebral gliomas:

Because the effect of curcumin on s.c. gliomas does not represent its effect on the intracerebral gliomas, we studied the latter. Athymic nude mice inoculated orthotopically with 5×10^5 U-87 glioblastoma cells were treated i.p. with 120 mg/kg/day of curcumin. Curcumin treatment was started at day 1 after tumor cell inoculation and was continued until the animal died. Treatment with curcumin led to a significant increase in animal survival time of 12% compared with untreated mice (average survival of 23.4 days vs. 20.9 days for control; log-rank test, $p < 0.05$). Figure 6 shows the survival rate of mice in this experiment.

Discussion

Glioblastoma multiforme continues to be the most common primary brain tumor in adults [2]; however, conventional treatments such as surgery, radiation and chemotherapy [3] cure only a minority of these patients. Therefore, significant effort has been made in researching the preventive effects of many micronutrients. In previous studies we and others have shown that many dietary products, including anthocyanidine [27] and green tea polyphenol [28], have chemopreventive properties due to their anti-angiogenic and anti-tumor activities. Among the natural products that possess chemopreventive and anticancer properties, curcumin has emerged as one of the most powerful.

In this study, we found that curcumin elicited a concentration-dependent inhibition of glioma cell proliferation, with an IC_{50} in the micromolar range. This IC_{50} is comparable to previously reported IC_{50} values for curcumin with other tumors such as lung, breast, oral, and renal cancer [29-32]. Because angiogenesis has been considered to play a central role in the pathogenesis of gliomas [33] and since a critical step in angiogenesis involves the local proliferation of endothelial cells [34], we further studied the effect of curcumin on proliferation of brain capillary endothelial cells. We observed that curcumin inhibited proliferation of the endothelial cells in a concentration-dependent manner. Our data on proliferation suggests that prolonged treatment with curcumin at the micromolar serum level might be a possible treatment strategy for gliomas. In addition, our results on proliferation indicated that the mechanisms of such anti-tumor effects by curcumin might be related to inhibition of glioma-induced angiogenesis as shown by the sensitivity of endothelial cells to curcumin. Because curcumin inhibited proliferation in endothelial cells better than in glioma cells, we further investigated the anti-angiogenic effects of this natural product.

Our results suggest that curcumin has the ability to block *in vitro* angiogenesis. Extensive studies have shown that angiogenesis is a crucial event for the outgrowth of cancer cells and their spreading into other tissues. The process is complex and involves a cascade of events. These events include enzymatic degradation of basement membranes by proteolytic enzymes secreted by the endothelial cells, endothelial cell migration, proliferation of these cells and

formation of vascular loops [35]. *In vitro* experiments revealed that the inhibitory effect of curcumin on these processes resulted partly due to the inhibition of two key events underlying angiogenesis, i.e. endothelial cell migration across the extracellular matrix and morphogenic differentiation of RBE4 cells into capillary-like structures. Furthermore, curcumin has been found to inhibit capillary endothelial cell growth and proliferation, as well as capillary formation in HUVECs [10,36]. Taken together, these results indicate that the anti-angiogenic activity of curcumin is not restricted to specific endothelial cell lines, and suggest that curcumin may be an angiogenesis inhibitor. In this study, we demonstrated that curcumin exerted significant anti-tumor effects on s.c. gliomas at a dose of 60 mg/kg/day. Previous works have shown that i.p. administration of 100 mg/kg of curcumin to female mice achieved a peak plasma level of 2.25 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 6 \mu\text{M}$) after 15 min which declined rapidly within the first 1 h [37]. Such a plasma level is in the range of concentrations which inhibited angiogenesis *in vitro* in our experiments. In addition, the toxicology and pharmacokinetics of curcumin have been reported in human and high oral curcumin dosing appears safe as there was no treatment-related toxicity up to 8 000 mg/day [38]. The serum concentrations of curcumin usually peaked at 1 to 2 h after oral intake and gradually declined within 12 h [38]. The average peak serum concentration after taking 8000 mg of curcumin was $1.77 \pm 1.83 \mu\text{M}$ [38]. Curcumin-mediated inhibition of tube formation and cell migration in the RBE4 cell line was observed at concentrations (between 1 and 3 μM) that may be generated through dietary intake of the natural product. The poor bioavailability of curcumin, due to metabolism by the liver and the intestinal wall [37], limits its anticancer activity. However, curcumin accumulation was clearly visible in the tumor sections from the curcumin-treated group (whereas the non-treated group did not show any). These observations are consistent with other reports [39-41] which support the hypothesis that, even with low intake of curcumin, this phenolic compound can be present in tumor tissue [41]. However, the BBB restricts the brain entry of many anticancer agents [6]. In this study, we demonstrated that curcumin could cross the BBB to a high level *in vitro*. These results are consistent with a previous *in vivo* report showing that one hour after dosing 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 1.6 \mu\text{M}$) of curcumin in the plasma, a concentration of 0.41 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 1.1 \mu\text{M}$) was found in mouse brain [37]. Taken together, these results suggest that achievable brain levels may be close to blood levels.

Our results also suggest that curcumin has the ability to block *in vivo* angiogenesis. Matrix metalloproteinase 9 has been reported to play a major role in glioma angiogenesis and invasion *in vivo* [42]. In addition, MMP-9 has been shown to be significantly higher in human glioblastoma tissue samples than in normal brain or in low-grade brain tumors [42]. Thus, compounds that can inhibit MMP-9 could be part of an efficient therapeutic strategy for the prevention and treatment of this disease. In this study, we show for the first time that curcumin decreased the gelatinolytic activity of MMP-9 in gliomas *in vivo*. These results are in agreement with a previous *in vitro* report showing that curcumin could inhibit the enzymatic activity of MMP-9 which had been induced by phorbol myristate acetate in three kinds of human glioma cells including U-87 [43]. Moreover, the inhibitory effect of curcumin on MMP-9 has also been reported with other cancer cells [44-46]. Considering that glioma invasion and angiogenesis progresses at least partly via MMP-9, the inhibition of this MMP by curcumin may possibly contribute to the anti-tumor effect of curcumin on gliomas *in vivo*. Moreover, we further demonstrated that curcumin suppressed angiogenesis *in vivo*, as shown by the concentration of hemoglobin in the tumor. The fact that the inhibitory effect of curcumin on neovascularization has also been demonstrated in the CAM model [47] as well as in a s.c. Matrigel plug assay [36], strongly supports the concept that, *in vivo*, curcumin may be an angiogenesis inhibitor.

In this study, we have also demonstrated that curcumin is capable of reducing the growth of s.c. gliomas in athymic mice before and after the establishment of tumors as demonstrated by slower tumor growth rate. Furthermore, curcumin affected intracerebral tumors prolonging animal survival time in mice bearing orthotopic intracranial gliomas. This is the first report showing the inhibitory effect of curcumin on brain cancer *in vivo*. The *in vivo* anti-tumor effect of curcumin had been studied in several other reports. In murine models, curcumin suppressed carcinogenesis in skin [48], lymphomas/leukemias [49], forestomach [50], colon [51] and liver [52]. In accordance with our results, these reports revealed that curcumin had a chemopreventive activity. The fact that the potent inhibitory effect of curcumin on cancer development has also been demonstrated in other animal models strongly supports the concept that *in vivo*, curcumin could be an ideal candidate for a chemopreventive agent. In

our study, the tumor-suppressive effect of curcumin was evident even when it was injected into mice after the tumor was established in both s.c. and intracerebral gliomas. Only a few studies have described the antitumoral activities of curcumin on tumor growth *in vivo* when administered as a therapeutic agent [53]. Here, we demonstrate that curcumin may be beneficial after the lesion has developed.

In conclusion, we have demonstrated that curcumin is capable of inhibiting the growth of glioma tumors in athymic mice before and after the establishment of tumor growth. The mechanism of such anti-tumor effects of curcumin was found to be related at least partly to the inhibition of glioma-induced angiogenesis as indicated by the concentration of hemoglobin in the tumors. The BBB is considered as a rate-limiting step for the penetration of drugs into the brain [6]. However, we show here that curcumin can cross a model BBB to a high level. This is the first report demonstrating the effects of curcumin on tumor growth and angiogenesis of gliomas. Because malignant gliomas are highly vascularized and the growth and survival of these tumors are dependent on an adequate blood supply [15], our results suggest the potential utility of curcumin for both chemopreventive and therapeutic applications in brain cancer.

Acknowledgments

We thank Constance Gagnon, Julie Poirier, Isabelle Lavallée and Normand Lapierre for their technical assistance. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Richard Béliveau. Dr. Béliveau holds a Research Chair in Cancer Prevention from Université du Québec à Montréal and a Research Chair in Neurosurgery (Claude-Bertrand) from Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Marie-Claude Perry is the recipient of a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

References

1. Brandes, A.A. (2003) State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol*, **30**, 4-9.
2. Grossman, S.A. and Batarra, J.F. (2004) Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol*, **31**, 635-44.
3. Glinski, B., Dymek, P. and Skolyszewski, J. (1998) Altered therapy schedules in postoperative treatment of patients with malignant gliomas. Twenty year experience of the Maria Sklodowska-Curie Memorial Center in Krakow, 1973-1993. *J Neurooncol*, **36**, 159-65.
4. Holland, E.C. (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*, **2**, 120-9.
5. Chintala, S.K., Tonn, J.C. and Rao, J.S. (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci*, **17**, 495-502.
6. de Vries, N.A., Beijnen, J.H., Boogerd, W. and van Tellingen, O. (2006) Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*, **6**, 1199-209.
7. Shishodia, S., Sethi, G. and Aggarwal, B.B. (2005) Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci*, **1056**, 206-17.
8. Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J. and Srimal, R.C. (2006) Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*, **78**, 2081-7.
9. Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M. and Diederich, M. (2005) Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*, **223**, 181-90.
10. Arbiser, J.L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M.T., Fisher, C., Flynn, E. and Byers, H.R. (1998) Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med*, **4**, 376-83.
11. Kieran, M.W. (2005) Anti-angiogenic therapy in pediatric neuro-oncology. *J Neurooncol*, **75**, 327-34.

12. Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, **61**, 253-70.
13. Rao, C.V., Simi, B. and Reddy, B.S. (1993) Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon. *Carcinogenesis*, **14**, 2219-25.
14. Denekamp, J. (1993) Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol*, **66**, 181-96.
15. Kesari, S., Ramakrishna, N., Sauvageot, C., Stiles, C.D. and Wen, P.Y. (2005) Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **5**, 186-97.
16. Leon, S.P., Folkerth, R.D. and Black, P.M. (1996) Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer*, **77**, 362-72.
17. Bian, X.W., Du, L.L., Shi, J.Q., Cheng, Y.S. and Liu, F.X. (2000) Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas. *Anal Quant Cytol Histol*, **22**, 267-74.
18. Demuth, T. and Berens, M.E. (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*, **70**, 217-28.
19. Dehouck, M.P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. and Tillement, J.P. (1992) Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem*, **58**, 1790-7.
20. Silver, F.H. and Trelstad, R.L. (1980) Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments. *J Biol Chem*, **255**, 9427-33.
21. Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V.V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G. and Dehouck, M.P. (1999) In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, **36**, 165-178.
22. Hendriks, H.R., Langdon, S., Berger, D.P., Breistol, K., Fiebig, H.H., Fodstad, O. and Schwartzmann, G. (1992) Comparative antitumour activity of vinblastine-isoleucinate and related vinca alkaloids in human tumour xenografts. *Eur J Cancer*, **28A**, 767-73.

23. el Hafny, B., Bourre, J.M. and Roux, F. (1996) Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, **167**, 451-60.
24. Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D. and Beliveau, R. (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta*, **1478**, 51-60.
25. McMahon, G.A., Petitclerc, E., Stefansson, S., Smith, E., Wong, M.K., Westrick, R.J., Ginsburg, D., Brooks, P.C. and Lawrence, D.A. (2001) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem*, **276**, 33964-8.
26. Lin, J.H. (2004) How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake? *Drugs Today (Barc)*, **40**, 5-22.
27. Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D. and Beliveau, R. (2006) Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, **27**, 989-96.
28. Annabi, B., Lee, Y.T., Martel, C., Pilorget, A., Bahary, J.P. and Beliveau, R. (2003) Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther*, **2**, 642-9.
29. Elattar, T.M. and Virji, A.S. (2000) The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res*, **20**, 1733-8.
30. Hong, R.L., Spohn, W.H. and Hung, M.C. (1999) Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res*, **5**, 1884-91.
31. Martin-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Galvez, M. and Ayuso, M.J. (2003) Curcumin as a DNA topoisomerase II poison. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **18**, 505-9.
32. Zhang, J., Qi, H. and Wu, C. (2004) [Research of anti-proliferation of curcumin on A549 human lung cancer cells and its mechanism]. *Zhong Yao Cai*, **27**, 923-7.
33. Bello, L., Giussani, C., Carrabba, G., Pluderi, M., Costa, F. and Bikfalvi, A. (2004) Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res*, **117**, 263-84.

34. Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-4.
35. Vacca, A., Ribatti, D., Pellegrino, A. and Dammacco, F. (2000) [Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects]. *Ann Ital Med Int*, **15**, 7-19.
36. Thaloor, D., Singh, A.K., Sidhu, G.S., Prasad, P.V., Kleinman, H.K. and Maheshwari, R.K. (1998) Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differ*, **9**, 305-12.
37. Pan, M.H., Huang, T.M. and Lin, J.K. (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*, **27**, 486-94.
38. Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. and Hsieh, C.Y. (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, **21**, 2895-900.
39. Ammon, H.P. and Wahl, M.A. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, **57**, 1-7.
40. Lin, J.K., Pan, M.H. and Lin-Shiau, S.Y. (2000) Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*, **13**, 153-8.
41. Somasundaram, S., Edmund, N.A., Moore, D.T., Small, G.W., Shi, Y.Y. and Orlowski, R.Z. (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res*, **62**, 3868-75.
42. Sawaya, R., Go, Y., Kyritsis, A.P., Uhm, J., Venkaiah, B., Mohanam, S., Gokaslan, Z.L. and Rao, J.S. (1998) Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase during tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 632-6.
43. Woo, M.S., Jung, S.H., Kim, S.Y., Hyun, J.W., Ko, K.H., Kim, W.K. and Kim, H.S. (2005) Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 1017-25.
44. Kim, J.H., Shim, J.S., Lee, S.K., Kim, K.W., Rha, S.Y., Chung, H.C. and Kwon, H.J. (2002) Microarray-based analysis of anti-angiogenic activity of demethoxycurcumin on human umbilical vein endothelial cells: crucial involvement of the down-regulation of matrix metalloproteinase. *Jpn J Cancer Res*, **93**, 1378-85.

45. Lin, L.I., Ke, Y.F., Ko, Y.C. and Lin, J.K. (1998) Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion in vitro and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion. *Oncology*, **55**, 349-53.
46. Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C.G. and Aggarwal, B.B. (2003) Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis*, **24**, 1269-79.
47. Gururaj, A.E., Belakavadi, M., Venkatesh, D.A., Marme, D. and Salimath, B.P. (2002) Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 934-42.
48. Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A. and Dunn, F.W. (1997) Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, **116**, 197-203.
49. Huang, M.T., Lou, Y.R., Xie, J.G., Ma, W., Lu, Y.P., Yen, P., Zhu, B.T., Newmark, H. and Ho, C.T. (1998) Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. *Carcinogenesis*, **19**, 1697-700.
50. Huang, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Newmark, H.L., Reuhl, K.R. and Conney, A.H. (1994) Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, **54**, 5841-7.
51. Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Kaskey, R.B., Rao, C.V. and Reddy, B.S. (1999) Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*, **59**, 597-601.
52. Chuang, S.E., Kuo, M.L., Hsu, C.H., Chen, C.R., Lin, J.K., Lai, G.M., Hsieh, C.Y. and Cheng, A.L. (2000) Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**, 331-5.
53. Sharma, R.A., Gescher, A.J. and Steward, W.P. (2005) Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, **41**, 1955-68.

Tables

Table I. *In vivo* anti-tumor activity of curcumin given intraperitoneally against subcutaneously implanted human malignant glioma. Curcumin (30, 60 or 120 mg/kg/day) administration began 5 days after U-87 inoculation into the right flank of the nude athimic mice, and the injection was repeated until the animals were sacrificed.

Table II. *In vivo* anti-tumor activity of curcumin given intraperitoneally against subcutaneously implanted human malignant glioma. Curcumin (60 mg/kg/day) administration began 7 days before U-87 inoculation (chemopreventive effect) or 3 days after cell implantation (therapeutic effect) into the right flank of the nude athimic mice, and the injection was repeated until the animals were sacrificed.

Figure legends

Figure 1. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin on U-87 human malignant glioma tumor xenografts grown subcutaneously in athymic nude mice. Curcumin (60 mg/kg/day) administration began 7 days before U-87 inoculation (chemopreventive effect) or 3 days after cell implantation (therapeutic effect) into the right flank of the mice. Curcumin (closed circles) or vehicle alone (open triangles) was injected into the intraperitoneal area once a day, and the injection was repeated until the animals were sacrificed. The tumor size was measured twice a week. The volume of the tumor was calculated from the formula $V = \text{length} \times \text{width} \times \text{height}$. (A) Chemopreventive effect ; (B) Therapeutic effect. Results represent the means of seven mice in each group and are expressed as average volume (mm^3) \pm SEM. Daily average tumor volumes for each group were compared throughout the course of the experiment using ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2. *In vitro* anti-angiogenic activities of curcumin. (A) Dose-dependent inhibition of human glioma cells (U-87) and rat brain capillary endothelial cells (RBE4) proliferation by curcumin. Cells were treated with various concentrations of curcumin for 48 h. Following curcumin treatment, cell replication was measured by [^3H]-thymidine incorporation assay as described in "Material and Methods". [^3H]-thymidine content was measured by liquid scintillation counting. (B) Migration assay; curcumin was tested at a range of concentrations for its ability to inhibit endothelial cell migration. Cells were harvested and migration assessed on collagen-coated filters using modified Boyden chambers as described in "Material and Methods". RBE4 cells which had migrated to the bottom surface were stained and the number of the migrated cells was quantified using Northern Eclipse software. Data are presented as the mean number of cells migrated per field of microscope (X 100 magnifications) compared to that observed with untreated cells. (C) Tube formation assay; endothelial cells were harvested and curcumin was tested at a range of concentrations for its ability to inhibit three-dimensional, capillary-like structure formation on collagen as described in "Material and Methods". Capillary-like tube formation was observed and photos were taken 96 h after seeding. The total length of capillary-like tubes was quantified and normalized with controls in five different areas using the Northern Eclipse software. Typical

pictures of capillary formation (bar = 50 μ m) and tube length measurement are shown. Data are presented as the mean tube length per field of microscope (X 100 magnifications) compared to that observed with untreated cells. Results are representative of three independent experiments, and the means \pm SEM are shown (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) (ANOVA).

Figure 3. *In vivo* anti-angiogenic activities of curcumin on human glioma tumor xenografts grown subcutaneously ; zymography assay. Zymography was performed on tumor homogenate proteins (20 μ g) from curcumin-treated mice and from a control group of mice. Zymograms were scanned by laser densitometry to evaluate the levels of gelatinolytic activity. (A) Typical picture of gelatinolytic activity of tumors from curcumin-treated mice and from control mice is shown. (B) Enzymatic activities of pro-MMP-9 and MMP-9. For each condition, n = 7, and the mean \pm SEM are shown (* p < 0.05).

Figure 4. *In vivo* anti-angiogenic activities of curcumin; angiogenesis assay. Athymic nude mice were injected subcutaneously with 2.5×10^6 U-87 human glioblastoma cells into the right flank. Intraperitoneal treatment with curcumin (60 mg/kg/day) or with vehicle alone was initiated on day 7 before tumor implantation into groups of seven mice each, and the injection was repeated daily until the animals were sacrificed and the tumors were excised. (A) Examples of s.c. gliomas after dissection are shown. Bar = 5 mm. (B) Quantification of neovessel formation by measurement of hemoglobin in tumors as described in "Material and Methods". For each condition, n = 7, and the mean \pm SEM are shown (** p < 0.01).

Figure 5. High transcytosis of curcumin across BBCEC. Apical-to-basolateral passage of curcumin (25 μ M) across BBCEC monolayers co-cultured with astrocytes was measured over 90 min in the presence of DMSO (control) or 25 μ M verapamil. At the end of the experiment, curcumin passage was quantified as described in "Materials and Methods". The results of a representative experiment are shown; bars, \pm SEM. (n =3).

Figure 6. Effect of curcumin on U-87 human malignant glioma tumor xenografts grown intracerebrally in athymic nude mice. The percentage of survivors over time among mice

that received intracranially implanted U-87 tumor cells (5×10^5 cells per mouse). Curcumin (120 mg/kg) administration began 1 day after cell implantation. Curcumin (dotted line) or vehicle alone (solid line) was injected into the intraperitoneal area once a day, and the injection was repeated until the animals were sacrificed. The average survival of animals treated with vehicle was 20.9 days, whereas the average survival of curcumin-treated mice was 23.4 days. Survival was statistically significantly prolonged in tumor-bearing ($n = 7$ in each group) nude mice treated with curcumin compared with survival in the group treated with vehicle (log-rank test, $p < 0.05$).

Dosage (mg/kg/day)	Tumor volume (mm³)	T/C^a (%)
0	537 ± 128	100
30	481 ± 59	89.6
60	307 ± 69	57.2
120	255 ± 74	47.5

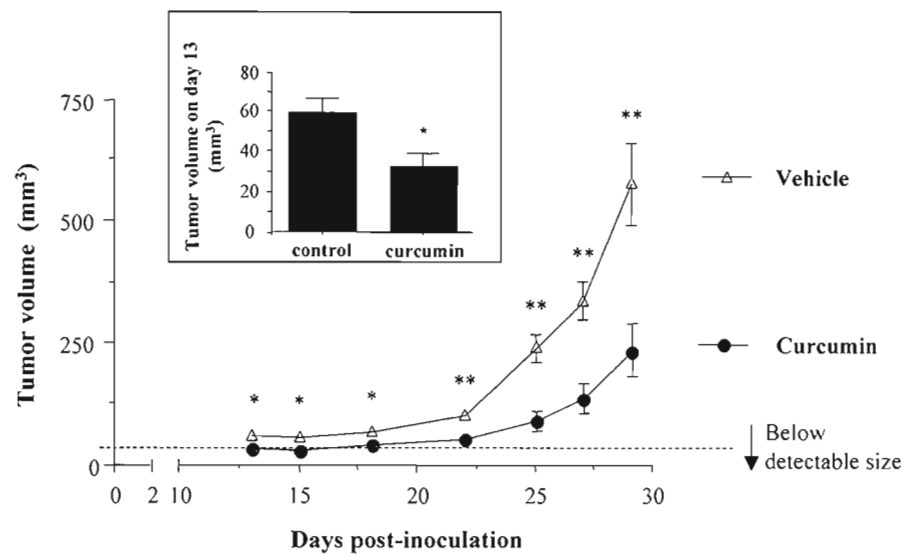
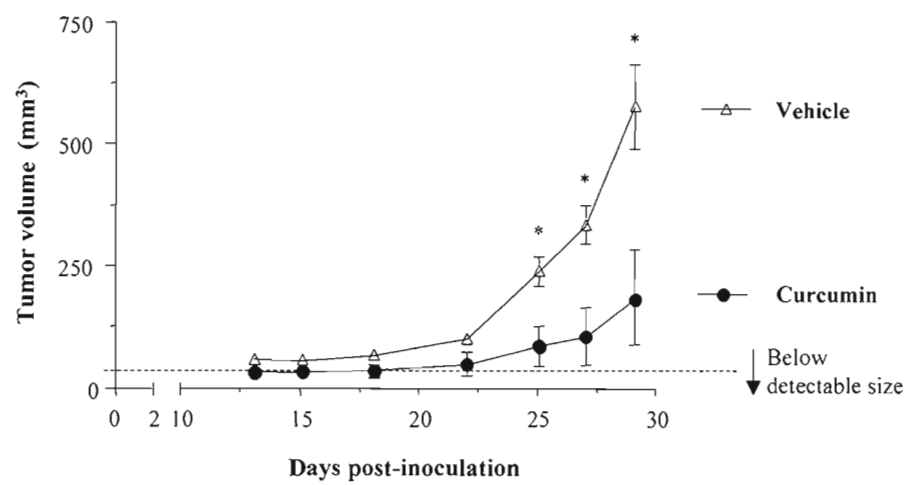
a. T/C = (Median tumor volume of curcumin-treated group/median tumor volume of control group)*100.

Table I

Treatment	Dosage (mg/kg/day)	Tumor volume (mm³)	T/C^a (%)
Control	0	580 ± 88	100
Chemopreventive	60	237 ± 53	40.9
Therapeutic	60	188 ± 98	32.4

a. T/C = (Median tumor volume of curcumin-treated group/median tumor volume of control group)*100.

Table II

A.**B.****Figure 1**

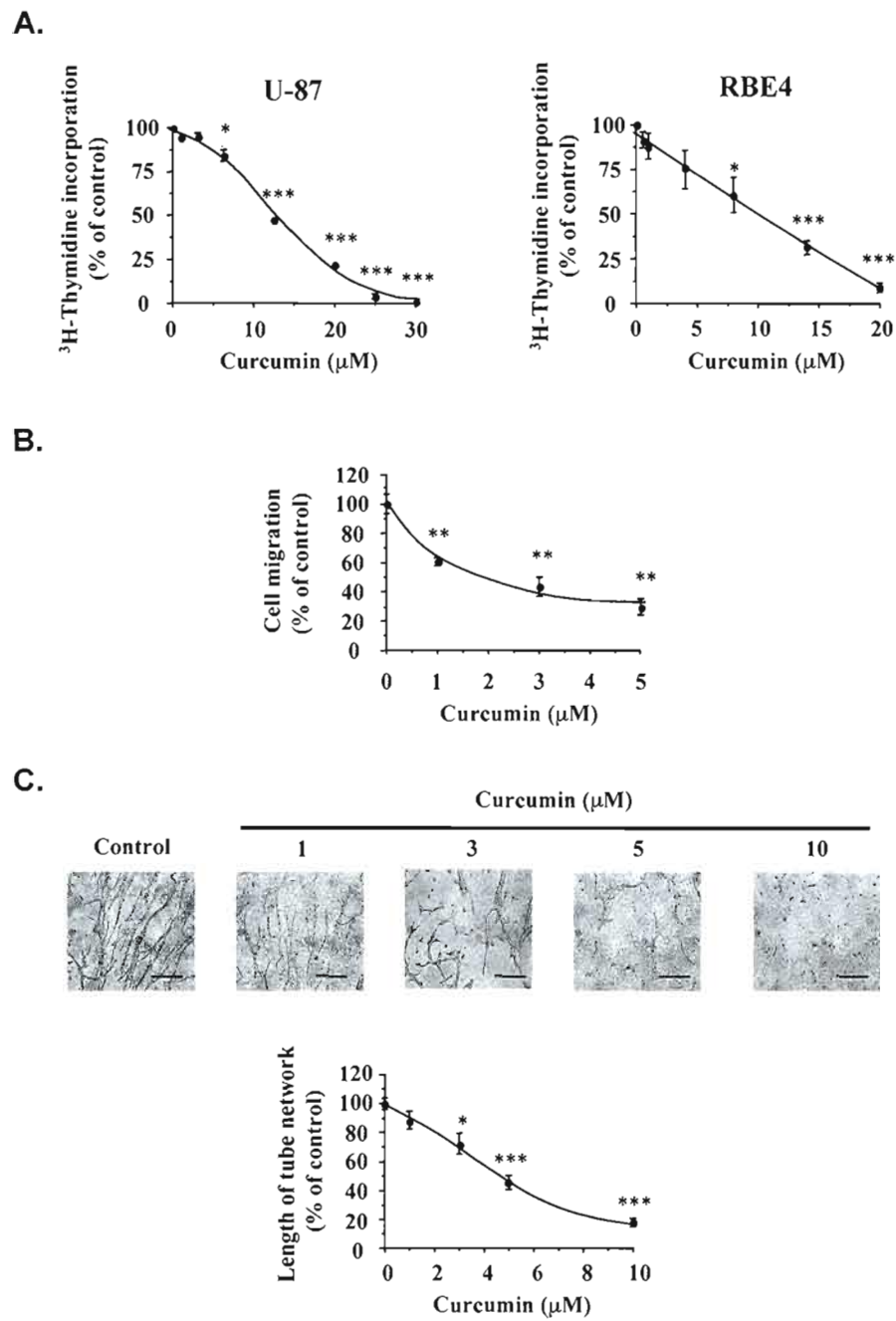
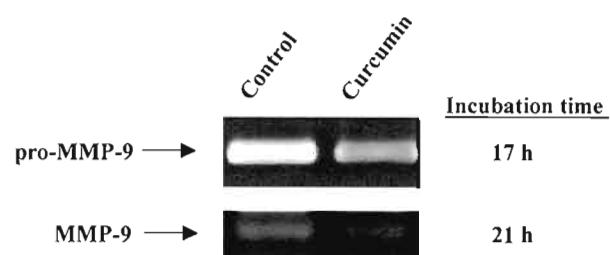
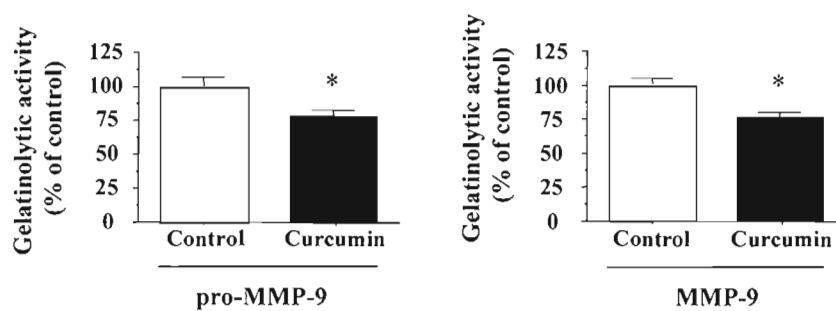
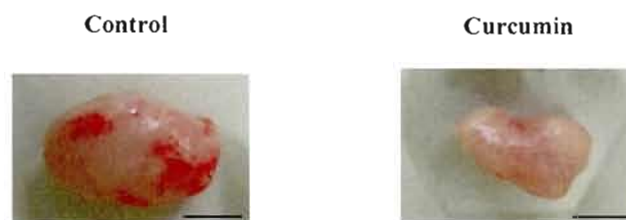


Figure 2

A.**B.****Figure 3**

A.



B.

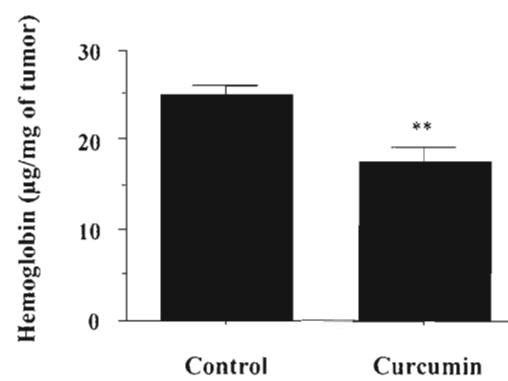
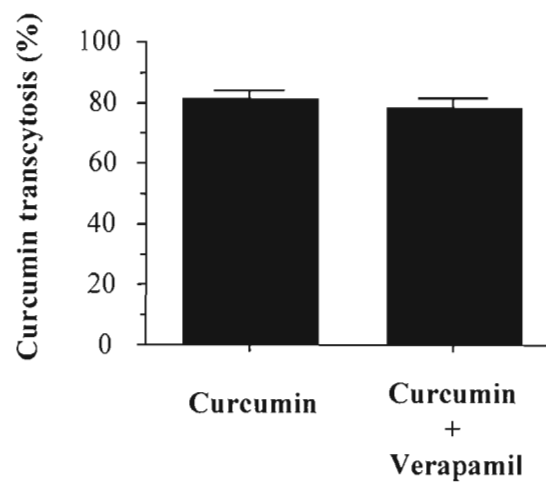
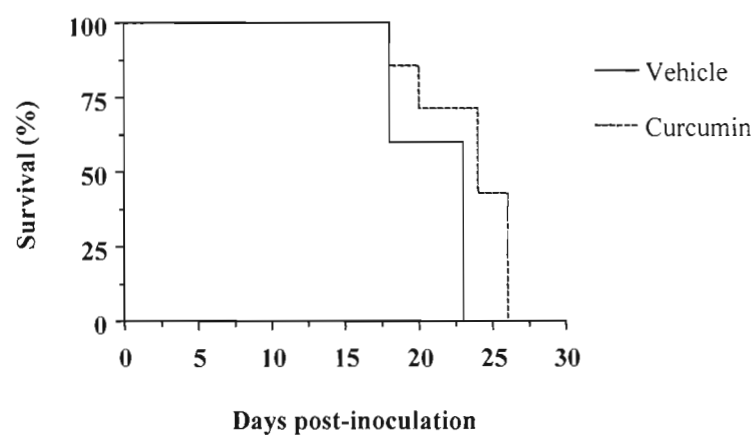


Figure 4

**Figure 5**

**Figure 6**

CHAPITRE VII

DISCUSSION

Les glioblastomes multiformes sont les tumeurs cérébrales les plus invasives et les plus répandues chez l'adulte (Giese et Westphal, 1996; Grossman et Batara, 2004). Leur traitement repose sur l'ablation, la radiothérapie et la chimiothérapie (Gilbert et Loghin, 2005). Cependant, ces options thérapeutiques ne parviennent à guérir qu'une minorité des patients atteints de cette pathologie (Desjardins et al., 2005; Gilbert et Loghin, 2005; Grossman et Batara, 2004; Walker et al., 1980). De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour la prévention et le traitement de cette maladie.

Depuis quelques dizaines d'années, un intérêt croissant s'est développé pour l'utilisation de composés naturels, dérivés de l'alimentation, afin de lutter contre le développement et la progression du cancer. Cet intérêt provient du fait que ces composés présentent peu de toxicité (Dorai et Aggarwal, 2004). D'autre part, comme des études épidémiologiques ont montré que plusieurs constituants de la diète permettaient de diminuer l'incidence de nombreux types de cancers, leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques est d'autant plus attrayante (Dorai et Aggarwal, 2004). Qui plus est, des travaux effectués dans notre laboratoire ainsi que par d'autres équipes de chercheurs ont démontré sur des modèles cellulaires et animaux que certaines molécules provenant de la nutrition avait une action anti-cancéreuse. Parmi les composés qui démontrent des propriétés anti-tumorales intéressantes, mentionnons les anthocyanidines (Lamy et al., 2006), les polyphénols du thé vert (Annabi et al., 2003), le resvératrol (Fulda et Debatin, 2006) et la curcumine (Araujo et Leon, 2001).

Ce projet de recherche visait à évaluer le potentiel d'utilisation de la curcumine, l'une des composantes actives du cari, dans le traitement des tumeurs cérébrales. Les résultats de ce mémoire démontrent : 1) que la curcumine réduit la croissance de cellules de GBM *in vitro*, 2) que la curcumine inhibe les principales étapes impliquées dans l'angiogenèse *in vitro*, 3)

que la transcytose de la curcumine au niveau de la BHE est élevée, 4) que la curcumine inhibe la croissance de GBM chez les souris athymiques, et 5) que la curcumine inhibe la néovascularisation des gliomes *in vivo*.

7.1 Effets de la curcumine sur la croissance des cellules tumorales

Au cours de ces travaux, nous avons d'abord démontré que la curcumine était capable d'inhiber la croissance de cellules de glioblastomes (U87) en fonction de la concentration. En effet, des études de prolifération cellulaire ont montré que la curcumine, à des concentrations de l'ordre du micro molaire, empêchait la croissance de cellules de gliomes. La concentration nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire a été évaluée, lors de nos travaux, à $11,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Selon plusieurs études, cette IC50 est semblable aux concentrations nécessaires pour inhiber la croissance d'autres lignées cancéreuses. En effet, des travaux ont montré que l'IC50 pour les cellules cancéreuses du poumon (A549) était de $18 \mu\text{M}$ (Zhang, Qi, et Wu, 2004), pour celles du sein (MCF-7 et autres) elle se situait entre 4 et $18 \mu\text{M}$ (Hong, Spohn, et Hung, 1999; Martin-Cordero et al., 2003), pour celles de la bouche (SCC-25) l'IC50 était de $10 \mu\text{M}$ (Elattar et Virji, 2000), pour celles de la peau (UACC-62) elle était de $4 \mu\text{M}$ (Martin-Cordero et al., 2003), alors que pour les cellules cancéreuses rénales (TK-10) l'IC50 était de $12 \mu\text{M}$ (Martin-Cordero et al., 2003). Nos résultats, ainsi que ces études, suggèrent que la curcumine puisse être utilisée pour le traitement de plusieurs types de cancer, y compris celui du cerveau.

7.2 Effets de la curcumine sur l'angiogenèse *in vitro*

Le niveau de vascularisation des tumeurs a été relié au caractère invasif et métastatique de nombreux cancers chez l'humain dont celui du sein (Toi et al., 1995; Toi, Kashitani, et Tominaga, 1993), de la prostate (Strohmeyer et al., 2000), du poumon (Dazzi et al., 1999), du côlon (Choi et al., 1998), du rectum (Choi et al., 1998), de l'œsophage (Kitadai et al., 1998), du col de l'utérus (Guidi et al., 1995) et du cerveau (Brem, Cotran, et Folkman, 1972). Ceci nous a amené à étudier l'impact de la curcumine sur le processus angiogénique.

Puisque la prolifération des cellules endothéliales est une étape critique dans le processus angiogénique (Folkman, 2003b; Hendrix et al., 2003), nous avons d'abord montré que la curcumine inhibait la croissance de ces cellules. Pour ce faire, nous avons employé la même technique d'incorporation de [^3H]-thymidine que celle que nous avons utilisée précédemment pour les U87, en prenant cette fois-ci des cellules endothéliales provenant de capillaires cérébraux de rat (*rat brain capillary endothelial cells*, RBE4). Nos résultats ont indiqué que la croissance des RBE4 était inhibée par la curcumine en fonction de la concentration avec une IC₅₀ de $8,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Cette IC₅₀ est légèrement, mais significativement, inférieure à la concentration de curcumine nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération des cellules gliales. Ces données nous ont amené à poursuivre nos études sur l'impact de la curcumine sur l'angiogenèse.

Nos résultats ont par la suite démontré que la curcumine inhibait la migration des cellules endothéliales. La formation d'un nouveau réseau vasculaire se fait en étapes séquentielles. Les cellules endothéliales doivent d'abord dégrader la matrice extracellulaire, migrer, proliférer, puis subir une morphogenèse afin de former de nouveaux capillaires (Yance et Sagar, 2006). Nos travaux ont indiqué que l'inhibition de la migration des RBE4 par la curcumine variait en fonction de la concentration avec une IC₅₀ de $1,3 \mu\text{M}$. En plus d'affecter la migration des cellules endothéliales, la curcumine inhibe également leur différenciation en capillaire, une autre étape essentielle à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, nos résultats ont mis en évidence le fait que la curcumine inhibait la formation de structures tubulaires des RBE4, en fonction de la concentration, avec une IC₅₀ de $3,5 \mu\text{M}$. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre équipe de chercheurs qui a montré que la curcumine inhibait la différenciation morphogénique des HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), une lignée de cellules endothéliales humaines isolées à partir de sang de cordon (Thaloor et al., 1998). Une IC₅₀ de $5 \mu\text{M}$ a été trouvée pour cette lignée cellulaire (Thaloor et al., 1998). L'inhibition de la morphogenèse des HUVECs variait aussi en fonction de la concentration (Thaloor et al., 1998). De plus, la prolifération et la croissance des HUVECs sont affectées par la curcumine en fonction de la concentration (Arbiser et al., 1998). Ces résultats indiquent que l'activité anti-angiogénique de la

curcumine n'est pas restreinte à une seule lignée cellulaire et suggèrent que la curcumine est un inhibiteur direct de l'angiogenèse puisqu'il entrave la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et leur différenciation.

Nos résultats indiquent qu'un traitement prolongé avec la curcumine, atteignant une concentration dans le sérum de l'ordre du micro molaire, pourrait permettre d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et leur différenciation. Tel qu'il a été mentionné, ces trois processus sont des étapes essentielles à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Yance et Sagar, 2006). Qui plus est, l'angiogenèse est considérée comme un élément clef dans la progression des gliomes (Bello et al., 2004). De toutes les tumeurs solides, ce sont les tumeurs cérébrales qui montrent le plus haut niveau de prolifération vasculaire (Brem et al., 1972). Le traitement des GBM échoue souvent car les tumeurs sont hautement résistantes à la chimiothérapie classique et à la radiothérapie (Desjardins et al., 2005; Gilbert et Loghin, 2005; Grossman et Batarra, 2004; Walker et al., 1980). Ces modalités de traitements ciblent les cellules se divisant rapidement sans se soucier des particularités de la tumeur, ceci expliquant partiellement leur inefficacité. Au cours des dix dernières années, la compréhension des mécanismes associés au développement des tumeurs cérébrales a permis l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées qui mettent l'emphasis sur les caractéristiques moléculaires des GBM. Parmi celles-ci, notons les modulations immunes, l'inhibition de voies de signalisation, une augmentation de l'apoptose et diverses techniques permettant d'accroître la biodisponibilité des agents anti-tumoraux (Basso et al., 2002; Castro et al., 2003; Rubin et Kieran, 1999; Sasaki et al., 1999). L'inhibition de la néovascularisation est également une avenue thérapeutique envisagée dans le traitement des GBM. Puisque la croissance des GBM est fortement dépendante de la mise en place d'un réseau vasculaire adéquat, l'inhibition de l'angiogenèse est une cible attrayante pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ces travaux, nous avons montré que l'administration de la curcumine permettait d'inhiber *in vitro* l'angiogenèse. Ce produit naturel pourrait donc être une stratégie de traitement pour les tumeurs cérébrales.

7.3 Passage élevé de la curcumine au niveau de la barrière hémato-encéphalique

Nous avons par la suite démontré que la curcumine était capable de traverser la barrière sang-cerveau. Pour qu'un médicament soit efficace, il doit être biodisponible aux doses requises au niveau de la tumeur. Or, la présence de la BHE empêche la plupart des agents de chimiothérapie d'atteindre le tissu cérébral, ce qui rend ces traitements anti-cancéreux vains. En utilisant un modèle développé par l'équipe du Dr Cecchelli nous avons montré que la curcumine traversait la BHE à 80% en l'espace de 90 minutes. Ce modèle *in vitro* de BHE imite très bien la situation *in vivo* dans laquelle les cellules endothéliales des capillaires cérébraux se trouvent, en séparant d'un côté du filtre les astrocytes et de l'autre les cellules endothéliales (Dehouck et al., 1995; Dehouck et al., 1992). Il génère la formation d'une barrière présentant toutes les caractéristiques de la BHE en termes de restriction de perméabilité et d'expression de transporteurs spécifiques (Dehouck et al., 1995; Dehouck et al., 1992), ce qui a permis l'analyse du passage de la curcumine. Ce modèle a d'ailleurs été utilisé à de nombreuses reprises pour étudier le transport de différents médicaments et les résultats obtenus *in vitro* corrèlent hautement avec ceux obtenus *in vivo* (Cecchelli et al., 1999). *In vivo*, l'accumulation de la curcumine dans divers tissus a été estimée par l'équipe du Dr Lin qui a montré qu'avec une concentration plasmatique initiale de curcumine de 0,6 µg/g (1,6 µM) chez la souris, on obtenait 1 heure plus tard une concentration de 0,41 µg/g (1,1 µM) dans le SNC (Pan, Huang, et Lin, 1999). Ceci équivaut au passage du deux tiers de la concentration plasmatique. Ces données, qui ne tiennent pas compte de l'élimination de la curcumine en fonction du temps, corrèlent bien avec les résultats que nous avons obtenus *in vitro*. Nos travaux, ainsi que cette étude, suggèrent que le niveau de curcumine atteint dans le tissu cérébral est semblable à celui qui peut être atteint au niveau plasmatique.

Nous avons donc démontré que la BHE était perméable à la curcumine. Plusieurs facteurs sont cruciaux pour déterminer l'entré passive (transcytose) de molécules dans le système nerveux central. Dû à la nature lipidique des membranes, l'un des facteurs les plus importants qui définit la transcytose au niveau de la BHE est la solubilité lipidique de la molécule (Habgood, Begley, et Abbott, 2000). Dans le cas des molécules hydrophiles, la vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille moléculaire (Habgood, Begley,

et Abbott, 2000). Cependant, ce facteur semble moins limitant pour la transcytose des molécules lipophiles (Habgood, Begley, et Abbott, 2000). La curcumine est une molécule de poids moléculaire faible qui a une structure similaire au rouge de Congo dont les charges seraient remplacées par des groupements polaires comme ceux de la chrysamine G qui elle-même est une molécule perméable à la BHE (Klunk, Debnath, et Pettegrew, 1994; Klunk, Jacob, et Mason, 1999). Ces caractéristiques structurales expliquent probablement que la BHE soit perméable à la curcumine. L'activité de transporteur à efflux, comme la P-gp, peut également prévenir l'accumulation significative de nombreux médicaments et molécules hydrophobes dans le SNC. La présence de ces transporteurs explique l'inefficacité de la plupart des agents chimiothérapeutiques dans le traitement des tumeurs cérébrales (Schinkel, 1999; van Asperen et al., 1997). Comme nos résultats ont montré une transcytose élevée pour la curcumine au niveau d'un modèle *in vitro* de la BHE et une absence d'impact du vérapamil (un inhibiteur de la P-gp), cette molécule ne semble pas être un substrat (ou du moins est un pauvre substrat) de la P-gp ou des autres transporteurs présents au niveau des capillaires sanguins cérébraux.

7.4 Effets de la curcumine sur le développement des glioblastomes *in vivo*

Après avoir montré que la curcumine inhibait la croissance de gliomes *in vitro* et qu'il était capable de traverser la BHE, nous avons implanté les cellules de GBM en sous-cutané et en intracrânien chez des souris athymiques afin d'évaluer son efficacité sur la croissance tumorale *in vivo*. Le modèle de tumeurs sous-cutanées utilisé facilite l'évaluation de l'impact du traitement sur la croissance tumorale puisqu'il permet de suivre l'expansion des tumeurs de jour en jour. Le modèle de tumeurs intracrâniennes permet quant à lui d'évaluer l'efficacité réelle du traitement sur la survie des animaux. Nous avons d'abord montré en employant le modèle de tumeur sous-cutanée que la curcumine était capable de ralentir la croissance tumorale avant et après l'établissement du cancer. Par la suite, en employant le modèle de tumeur en intracrânien, nous avons montré que la curcumine avait un effet bénéfique sur la survie des animaux. Le modèle animal de tumeur cérébrale implantée en intracrânien utilisé lors de nos expériences est extrêmement résistant à la chimiothérapie et se

développe très rapidement. La durée de survie moyenne des souris malades non-traitées est de 20,9 jours. En administrant la curcumine, sous forme d'injection intrapéritonéale, elles survivent jusqu'à 23,4 jours. Nos résultats sont les premiers à démontrer l'effet de la curcumine sur la croissance des GBM *in vivo*. D'autres études ont montré l'effet inhibiteur de la curcumine sur le développement de différentes tumeurs *in vivo*. En effet, dans des modèles murins, on a démontré que la curcumine inhibait la carcinogenèse de la peau, des lymphomes, des leucémies, du pré-estomac, du colon et du foie (Chuang et al., 2000; Huang et al., 1994; Huang et al., 1998; Kawamori et al., 1999; Limtrakul et al., 1997). Comme dans nos travaux, ces études montrent que la curcumine a un effet chimiopréventif sur le développement du cancer. Le fait qu'on ait démontré que la curcumine avait une activité inhibitrice sur le développement du cancer dans d'autres modèles animaux appuie le concept qu'*in vivo* ce produit naturel pourrait être un excellent candidat comme agent chimiopréventif. Dans nos études, l'effet anti-tumoral de la curcumine était évident même lorsqu'il était administré après que la tumeur ait commencé à croître. Seulement quelques études ont rapporté un effet anti-tumoral pour la curcumine lorsqu'elle était administrée comme agent thérapeutique (Sharma et al., 1994). Nos travaux constituent donc une piste encourageante dans la recherche d'un agent de prévention ou d'une stratégie thérapeutique pour les GBM.

7.5 Effets de la curcumine sur la néovascularisation des glioblastomes *in vivo*

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence que la curcumine exerçait un effet anti-tumoral sur la croissance de gliomes implantés en sous-cutané chez des souris athymiques. La dose de curcumine utilisée lors de ces expériences était de 60 mg/kg. Des études effectuées par l'équipe du Dr Lin (1999) avaient montré que l'administration intrapéritonéale de 100 mg/kg de curcumine permettait d'obtenir une concentration plasmatique de 2,25 µg/mL (6 µM) chez des souris femelles. Cette concentration plasmatique était atteinte en 15 minutes, suivant l'injection de curcumine et déclinait rapidement dans la première heure (Pan et al., 1999). Nos travaux ont démontré que les concentrations de curcumine nécessaires pour inhiber la migration et la formation de tube chez les RBE4 se situaient entre 1 et 3 µM. Ces

concentrations sont du même ordre que celles atteintes dans le plasma de la souris lors de l'injection de curcumine. De plus, de telles concentrations plasmatiques peuvent être obtenues chez l'humain. En effet, suivant l'ingestion de 8000 mg de curcumine, une concentration plasmatique de $1,77 \pm 1,83 \mu\text{M}$ est observé chez l'homme (Cheng et al., 2001). Cette dose, administrée quotidiennement sur une période de trois mois, semble non toxique puisque aucun effet secondaire n'a été observé (Cheng et al., 2001). Suivant l'ingestion, la concentration de curcumine atteignait son pic plasmatique en l'espace de 1 à 2 heures pour ensuite décliner graduellement dans les 12 heures qui suivaient (Cheng et al., 2001). Dans les populations asiatiques où la consommation de curcumine est particulièrement élevée, les adultes ingèrent jusqu'à 200 mg de cette épice par jour (Commandeur et Vermeulen, 1996). Cette quantité de curcumine ne permet pas, à elle seule, d'atteindre les concentrations plasmatiques dont il est question dans cette étude. Cependant, l'équipe de Srinivas (Shoba et al., 1998) a montré que la piperine, une molécule qui fait partie de l'alimentation de ces populations et qui est retrouvée dans le poivre, permettait d'accroître la bioabsorption de la curcumine de 2000%. Quoiqu'aucune étude n'ait porté sur le sujet, il est possible que les concentrations plasmatiques de curcumine nécessaires pour inhiber l'angiogenèse dans cette recherche puissent être atteintes dans ces populations. Ceci pourrait expliquer en partie les écarts élevés existants entre les taux de certains cancers en Inde et ceux dans les pays occidentaux (où la consommation de curcumine est beaucoup plus faible). Puisque les concentrations nécessaires pour inhiber l'angiogenèse *in vitro* sont atteintes *in vivo* chez la souris lors des traitements avec la curcumine, l'effet anti-tumoral observé lors de nos expériences pourrait être dû à un effet anti-angiogénique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'impact du traitement sur l'expression de métalloprotéases de la matrice, des marqueurs moléculaires importants lors de l'angiogenèse, ainsi que sur la teneur en hémoglobine de la tumeur, un indicateur du niveau de vascularisation de cette dernière.

Nous avons tout d'abord observé, en utilisant la technique de zymographie, que la curcumine inhibait l'activité gélatinolytique de pro-MMP-9 et de MMP-9 dans les tumeurs sous-cutanées des souris traitées. On a démontré que l'expression de MMP-9 jouait un rôle majeur lors de la néovascularisation des GBM (Sawaya et al., 1998). De plus, cette enzyme de dégradation de la matrice extracellulaire est également importante pour le processus

d'invasion des gliomes. Les cellules cancéreuses des GBM ont pour caractéristique d'envahir le tissu sain avoisinant la tumeur (Chintala et al., 1999) ce qui explique pourquoi la chirurgie réussit rarement à enlever la totalité de la masse tumorale et, par conséquent, n'empêche pas la tumeur de réapparaître (Giese et Westphal, 1996). Le niveau d'invasion est donc considéré comme étant un déterminant majeur dans le degré de malignité des gliomes. L'invasion des cellules tumorales est un processus qui s'effectue de manière séquentielle (Chintala et al., 1999). Pour que les cellules soient capables d'envahir le tissu avoisinant, elles doivent d'abord traverser la barrière extracellulaire en s'attachant à la matrice, dégrader celle-ci par protéolyse et finalement migrer à travers (Chintala et al., 1999). *In vitro*, l'habileté des cellules tumorales à migrer à travers la matrice extracellulaire se fait via l'expression coopérative d'intégrines, une famille de récepteurs d'adhésion, et des protéinases de surface cellulaire telles que les uPA et les MMPs (Lakka et al., 2005). Des études récentes sur les mécanismes d'invasion des GBM suggèrent que la famille des MMPs joue un rôle critique dans ce processus. Plus particulièrement, l'expression des collagénases MMP-2 et MMP-9 est corrélée avec le degré d'invasion et de croissance des gliomes (Brown et al., 1993; Forsyth et al., 1999). De plus, le niveau de MMP-9 est hautement relié avec le grade histologique des gliomes (Rao et al., 1993). Par ailleurs, des études ont montré que l'inhibition de l'expression du gène codant pour MMP-9 dans la lignée cellulaire de glioblastome SNB19 entravait la formation de tumeurs chez les souris athymiques (Kondraganti et al., 2000; Lakka et al., 2005). Ces travaux démontrent l'importance de MMP-9 dans l'invasion et la croissance tumorales. Ainsi, des agents capables d'inhiber l'expression ou l'activation de MMP-9 pourraient faire partie d'une stratégie thérapeutique efficace dans la prévention et le traitement du cancer du cerveau. Des études *in vitro* ont montré que la curcumine était capable d'inhiber l'activité enzymatique de MMP-9 induite par l'ester de phorbol (phorbol 12-myristate 13-acetate) chez trois lignées de gliomes humains, incluant les U87 (Woo et al., 2005). De plus, l'effet inhibiteur de la curcumine sur MMP-9 a été observé sur d'autres lignées cancéreuses (Kim et al., 2002; Lin et al., 1998; Shishodia et al., 2003). Ces travaux viennent corroborer les résultats que nous avons obtenus *in vivo*. Ces données laissent supposer que l'un des mécanismes d'action de la curcumine expliquant son effet anti-tumoral *in vivo* pourrait être relié à une inhibition de l'invasion et de la néovascularisation des GBM.

Nos résultats *in vitro* ont montré que la curcumine possède une activité anti-angiogénique. Le traitement des souris par ce produit naturel devrait donc diminuer le nombre de vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur confirmant ainsi son action *in vivo*. Le dosage de l'hémoglobine contenue dans la tumeur a permis de quantifier le niveau de prolifération des vaisseaux sanguins. Nos résultats ont montré que les tumeurs sous-cutanées des souris ayant reçu de la curcumine avait une concentration d'hémoglobine moindre que les tumeurs provenant des souris non-traitées. Ces données suggèrent que la curcumine inhibe la néovascularisation induite par les gliomes. D'autres résultats *in vivo* viennent appuyer les conclusions de notre étude. En effet, il a été démontré que la curcumine avait une activité inhibitrice sur la néovascularisation *in vivo* tel qu'indiqué par des expériences impliquant des implants sous-cutanés de matrigel et le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (*chorioallantoic membrane*, CAM) (Gururaj et al., 2002; Thaloor et al., 1998). De plus, nos résultats ont montré une diminution de l'activité gélatinolytique des MMP-9 *in vivo*, une enzyme importante pour le processus angiogénique. L'ensemble de ces résultats suggère que la curcumine est un inhibiteur de l'angiogenèse *in vivo* ce qui expliquerait en partie son action anti-tumorale sur la croissance des gliomes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les gliomes malins, qui n'ont actuellement aucun traitement efficace, constituent le type de tumeur cérébrale le plus répandu chez l'homme adulte. Les résultats présentés dans ce mémoire permettent d'ouvrir la voie à de nouvelles options thérapeutiques dans le traitement de ce type de cancer. En effet, l'identification de la curcumine comme inhibiteur naturel de la croissance des gliomes et du processus angiogénique qu'ils induisent suggère que cette molécule présente des propriétés anti-tumorale et anti-angiogénique intéressantes qui pourraient être utile dans la prévention et le traitement des gliomes. Nos résultats sont les premiers à démontrer l'effet de la curcumine sur le développement des GBM *in vivo*.

Puisque la croissance d'une tumeur solide est fortement dépendante de la mise en place d'un réseau vasculaire adéquat, l'inhibition de l'angiogenèse est une cible attrayante pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques (Folkman, 2003). Cette cible s'avère d'autant plus attrayante dans le cas des glioblastomes qui se caractérisent par un degré de vascularisation très élevé (Bello et al., 2004; Brem et al., 1972). Toutefois, les agents anti-angiogéniques seuls semblent avoir une efficacité limitée dans le traitement du cancer (Yance et Sagar, 2006). Cependant, des études chez les animaux ont démontré un effet synergique significatif de la thérapie anti-angiogénique combinée avec la radiation ou la chimiothérapie (Sterba, Pavelka, et Slampa, 2002). Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel de la curcumine en combinaison avec des agents de chimiothérapie ou la radiothérapie dans le traitement des tumeurs intracrâniennes. Cette avenue thérapeutique est d'autant plus intéressante à approfondir pour le traitement du cancer du cerveau puisque des études ont montré que la curcumine était un inhibiteur naturel de la P-gp (Romiti et al., 1998). La présence de la P-gp au niveau de la BHE et des cellules tumorales limite grandement l'efficacité des médicaments de chimiothérapie dans le traitement des tumeurs cérébrales (Fromm, 2004; Lin, 2004). D'une part, elle diminue l'accès de ces agents au tissu cérébral et d'autre part, elle limite leur accumulation à l'intérieur de leurs cellules cibles, c'est-à-dire les cellules cancéreuses. Des études de photomarquage et d'accumulation ont montré que la curcumine inhibait les activités de liaison et de transport de la P-gp (Romiti et al., 1998). Les animaux, dont les fonctions de la P-gp sont réduites, présentent une accumulation des

substrats de la P-gp au niveau du cerveau et sont plus sensibles aux substrats toxiques du transporteur tel que l'ivermectin (Nobmann, Bauer, et Fricker, 2001; Schinkel et al., 1994). Ainsi, il serait logique de supposer que la curcumine pourrait augmenter le passage des agents de chimiothérapie au niveau de la BHE. Au cours de ma maîtrise, j'ai effectué une série d'expériences, avec le modèle de BHE développé par l'équipe du Dr Cechelli, qui tendent à confirmer cette hypothèse (résultats présentés dans l'appendice A). Afin de vérifier si la curcumine potentialise l'action des médicaments de chimiothérapie (ou de la radiation) dans les cellules tumorales, des essais de prolifération sur diverses lignées de glioblastome en culture pourraient être faits. Par la suite, l'action potentialisatrice de la curcumine pourrait être démontrée *in vivo* en traitant des souris immunosupprimées ayant subi une implantation de cellules cancéreuses en intracrânien. Selon les résultats obtenus lors de ces expériences, une nouvelle approche pour augmenter l'effet d'agents thérapeutiques utilisés dans le traitement des tumeurs cérébrales pourrait être envisagée.

APPENDICE A

TABEAU 3 : Effet de la curcumine sur l'activité de transport de la P-gp dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovin (BBCEC). La transcytose du [³H]taxol (50 nM), du [³H]étoposide (50 nM) ou de la [³H]vinblastine (20 nM) du côté apical vers le domaine basolatéral des cellules endothéliales de la monocouche de BBCEC co-cultivée avec des astrocytes a été mesurée pendant 90 minutes en présence de DMSO (témoin) ou de 25 µM de curcumine. De plus, l'accumulation intracellulaire du [³H]taxol, du [³H]étoposide ou de la [³H]vinblastine, mis en présence ou en absence de 25 µM de curcumine, a été mesurée en récupérant les filtres contenant les BBCEC. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin. Les résultats sont représentatifs de trois expériences et sont exprimés en moyenne ± SEM (écart-type de la moyenne). Le test de Student a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes des 2 groupes (témoin et +curcumine). Le seuil de signification statistique retenu est 0,05 (*p< 0,05, **p< 0,01).

MÉDICAMENTS	TRANSCYTOSE (pmol/cm ²)		ACCUMULATION INTRACELLULAIRE (%)	
	Témoin	+ Curcumine	Témoin	+ Curcumine
TAXOL	0,47 ± 0,03	0,57 ± 0,02 *	2,4 ± 0,2	3,9 ± 0,3 *
ÉTOPOSIDE	0,39 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,54 ± 0,04 *
VINBLASTINE	0,44 ± 0,02	0,63 ± 0,06 **	3,1 ± 0,7	5,4 ± 0,4 *

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., et Bharti, A. C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 23(1A), 363-398.
- Araujo, C. C., et Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(5), 723-728.
- Arya, M., Bott, S. R., Shergill, I. S., Ahmed, H. U., Williamson, M., et Patel, H. R. (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol*, 15(3), 117-128.
- Beaulieu, E., Demeule, M., Ghitescu, L., et Beliveau, R. (1997). P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J*, 326 (Pt 2), 539-544.
- Begley, D. J. (2004). ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 10(12), 1295-1312.
- Bello, L., Giussani, C., Carrabba, G., Pluderi, M., Costa, F., et Bikfalvi, A. (2004). Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res*, 117, 263-284.
- Bendayan, R., Lee, G., et Bendayan, M. (2002). Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech*, 57(5), 365-380.
- Bergers, G., et Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 401-410.
- Brandes, A. A. (2003). State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol*, 30(6 Suppl 19), 4-9.
- Brem, S., Cotran, R., et Folkman, J. (1972). Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*, 48(2), 347-356.
- Cao, X., Ma, L. Q., Rhue, D. R., et Appel, C. S. (2004). Mechanisms of lead, copper, and zinc retention by phosphate rock. *Environ Pollut*, 131(3), 435-444.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4), 389-395.

- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936.
- Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V. V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., et Dehouck, M. P. (1999). In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 36(2-3), 165-178.
- Chintala, S. K., Tonn, J. C., et Rao, J. S. (1999). Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci*, 17(5-6), 495-502.
- Choi, H. J., Hyun, M. S., Jung, G. J., Kim, S. S., et Hong, S. H. (1998). Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*, 55(6), 575-581.
- Commandeur, J. N., et Vermeulen, N. P. (1996). Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds. The case of curcumin. *Xenobiotica*, 26(7), 667-680.
- Demeule, M., Regina, A., Annabi, B., Bertrand, Y., Bojanowski, M. W., et Beliveau, R. (2004). Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors. *Mol Neurobiol*, 30(2), 157-183.
- Distler, O., Neidhart, M., Gay, R. E., et Gay, S. (2002). The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*, 21(1), 33-49.
- Dohrmann, G. J. (1970). The choroid plexus: a historical review. *Brain Res*, 18(2), 197-218.
- Dorai, T., et Aggarwal, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 215(2), 129-140.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., et Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*, 223(2), 181-190.
- Elattar, T. M., et Virji, A. S. (2000). The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res*, 20(3A), 1733-1738.
- Feron, O. (2004). Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 25(10), 536-542.

- Ferrara, N., et Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967-974.
- Fischer, I., Gagner, J. P., Law, M., Newcomb, E. W., et Zagzag, D. (2005). Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*, 15(4), 297-310.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82(1), 4-6.
- Folkman, J. (2003). Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer Biol Ther*, 2(4 Suppl 1), S127-133.
- Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, 312(5), 594-607.
- Fromm, M. F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*, 25(8), 423-429.
- Fujimaki, T. (2005). Surgical treatment of brain metastasis. *Int J Clin Oncol*, 10(2), 74-80.
- Giese, A., et Westphal, M. (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, 39(2), 235-250; discussion 250-232.
- Gilbert, M. R., et Loghin, M. (2005). The Treatment of Malignant Gliomas. *Curr Treat Options Neurol*, 7(4), 293-303.
- Grossman, S. A., et Batara, J. F. (2004). Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol*, 31(5), 635-644.
- Habgood, M. D., Begley, D. J., et Abbott, N. J. (2000). Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol*, 20(2), 231-253.
- Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C., et Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1), 25-39.
- Jette, L., Pouliot, J. F., Murphy, G. F., et Beliveau, R. (1995). Isoform I (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. Evidence for cross-

- reactivity of antibody C219 with an unrelated protein. *Biochem J*, 305 (Pt 3), 761-766.
- Jodoin, J., Demeule, M., et Beliveau, R. (2002). Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim Biophys Acta*, 1542(1-3), 149-159.
- Kargiotis, O., Rao, J. S., et Kyritsis, A. P. (2006). Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*, 78(3), 281-293.
- Kitadai, Y., Haruma, K., Tokutomi, T., Tanaka, S., Sumii, K., Carvalho, M., Kuwabara, M., Yoshida, K., Hirai, T., Kajiyama, G., et Tahara, E. (1998). Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res*, 4(9), 2195-2200.
- Kleihues, P., et Sobin, L. H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, 88(12), 2887.
- Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D., et Beliveau, R. (2006). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, 27(5), 989-996.
- Liekens, S., De Clercq, E., et Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 61(3), 253-270.
- Lin, J. H. (2004). How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake? *Drugs Today (Barc)*, 40(1), 5-22.
- Ling, V., et Thompson, L. H. (1974). Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol*, 83(1), 103-116.
- Loscher, W., et Potschka, H. (2005). Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*, 76(1), 22-76.
- Louis, D. N., Pomeroy, S. L., et Cairncross, J. G. (2002). Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell*, 1(2), 125-128.
- Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., et Srimal, R. C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*, 78(18), 2081-2087.

- Martin-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Galvez, M., et Ayuso, M. J. (2003). Curcumin as a DNA topoisomerase II poison. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18(6), 505-509.
- Mignatti, P., et Rifkin, D. B. (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*, 49(1-3), 117-137.
- Miller, D. S., Nobmann, S. N., Gutmann, H., Toeroek, M., Drewe, J., et Fricker, G. (2000). Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol*, 58(6), 1357-1367.
- Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N. E., Maquoi, E., Cataldo, D., et Foidart, J. M. (2004). Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol*, 57(6), 577-584.
- Pan, M. H., Huang, T. M., et Lin, J. K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*, 27(4), 486-494.
- Pepper, M. S. (1997). Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(4), 605-619.
- Pepper, M. S. (2000). Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique. *Médecine/sciences*, 16(12), 1378-1386.
- Preusser, M., Haberler, C., et Hainfellner, J. A. (2006). Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr*, 156(11-12), 332-337.
- Rao, J. S., Steck, P. A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., et Sawaya, R. (1993). Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res*, 53(10 Suppl), 2208-2211.
- Ray, J. M., et Stetler-Stevenson, W. G. (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*, 7(11), 2062-2072.
- Romiti, N., Tongiani, R., Cervelli, F., et Chieli, E. (1998). Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Life Sci*, 62(25), 2349-2358.
- Ruetz, S., et Gros, P. (1994). Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*, 77(7), 1071-1081.

- Shishodia, S., Sethi, G., et Aggarwal, B. B. (2005). Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci*, 1056, 206-217.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., et Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*, 64(4), 353-356.
- Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M., van Roon, M. A., et al. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75(3), 451-462.
- Sterba, J., Pavelka, Z., et Slampa, P. (2002). Concomitant radiotherapy and metronomic temozolomide in pediatric high-risk brain tumors. *Neoplasma*, 49(2), 117-120.
- Strohmeyer, D., Rossing, C., Strauss, F., Bauerfeind, A., Kaufmann, O., et Loening, S. (2000). Tumor angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. *Prostate*, 42(1), 26-33.
- Weidner, N. (1995). Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 147(1), 9-19.
- Yance, D. R., Jr., et Sagar, S. M. (2006). Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther*, 5(1), 9-29.
- Zhang, J., Qi, H., et Wu, C. (2004). [Research of anti-proliferation of curcumin on A549 human lung cancer cells and its mechanism]. *Zhong Yao Cai*, 27(12), 923-927.